

# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS  
NEW YORK

NOBURÔ KAMIYA  
OSAKA

SIEGFRIED STRUGGER  
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK  
ROSTOCK

FRIEDL WEBER  
GRAZ

KARL HÖFLER  
WIEN

BAND XLVII, HEFT 3—4 (SCHLUSSHEFT)

MIT 106 TEXTABBILDUNGEN UND 17 ABBILDUNGEN AUF 2 TAFELN  
ABGESCHLOSSEN AM 19. NOVEMBER 1956



WIEN  
SPRINGER-VERLAG  
1956

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint swanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Speck, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: U 25-5-00 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Besitzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen.

Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLVII. Band

Inhaltsverzeichnis

3.—4. Heft

Abhandlungen

Seite

Freytag, K.: Optik und Feinbau der Schleimzellen in den Knollen verschiedener <i>Orchis</i> -Arten . . . . .	237
Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Zucker und mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Alkalien auf das Pflanzenplasma . . . . .	242
Weinmann, W. D.: Untersuchungen über die Protein- und Nukleinsäurefraktionen des Zellkernes . . . . .	259
Kaja, H.: Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von <i>Chlorophytum comosum</i> (Thunb.) Bak. . . . .	280
Wiercinski, F. J.: The Microinjection of Adenosine Triphosphate into the Protoplasm of Skeletal Muscle Fibers . . . . .	298
Wartenberg, A.: Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. I. Die Wanderungsrichtung in der Kataphorese . . . . .	305
Wartenberg, A.: Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. II. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Kataphorese . . . . .	324
Miličić, D.: Virus-Zelleinschlüsse in <i>Alliaria officinalis</i> . . . . .	341
Umrath, K.: Elektrische Messungen und Reizversuche an <i>Amoeba proteus</i> . . . . .	347
Drawert, H., und Ingeborg Metzner: Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot . . . . .	359
Erdmann, K.: Zusammenhänge zwischen reduzierenden Eigenschaften und Schutzwirkung von SH-Verbindungen gegen Strahlen . . . . .	384
Butterfaß, Th.: Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserwegs in pflanzlichen Kapillaren . . . . .	398

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite



# Optik und Feinbau der Schleimzellen in den Knollen verschiedener *Orchis*-Arten

Von

Kurt Freytag

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. Dezember 1955)

## 1. Material

Die gepulverten Knollen gewisser Orchideenarten (*Orchis masculus*, *O. morio*, *O. militaris*, *Platanthera bifolia* u. a.) sind im Handel als *Tubera salep* erhältlich. Die gepulverten Knollen mit den darin reichlich enthaltenen Schleimzellen stellten das Material für die vorliegenden Untersuchungen dar.

## 2. Die optischen Erscheinungen der Schleimzellen

Im trockenen Zustand erscheinen die Schleimzellen im polarisierten Licht sehr stark doppelbrechend. Man erkennt unregelmäßige Bereiche verschiedenen hoher Doppelbrechung, zum Teil beobachtet man das Auftreten von Polarisationsfarben höherer Ordnung. Eine besondere feinbauliche Ordnung ist aus diesen Bildern nicht zu erschließen.

Benetzt man die Zellen mit Wasser, so sinkt die Doppelbrechung und es erscheint ein positives Polarisationskreuz, wenn sich die Zelle mit ihrer Unter- oder Oberseite dem Betrachter darbietet. Der Umriss der Zelle in dieser Ansicht erscheint rund. Schon nach kurzer Zeit vermindert sich die optische Anisotropie bei gleichzeitiger Vergrößerung der Zelle, bis schließlich der Zellinhalt verquollen und damit isotrop ist. Czaja (1954) empfiehlt die Beachtung des optischen Vorzeichens der Salep-Schleimzellen zur leichteren pharmakognostischen Unterscheidung gegenüber anderen Pflanzenschleimzellen.

Die nach der Verquellung zurückbleibende Zellwand besitzt einen Folienbau, der optische Schnitt durch die Membran und Falten sind positiv doppelbrechend zu ihrem Verlauf, in Blickrichtung senkrecht zur Fläche der Zellwand herrscht Isotropie.

Dieselben optischen Erscheinungen wie beim Quellen der Salep-Schleim-

zellen hat Frey-Wyssling (1953) bei den mannanhaltigen Zellen in den Knollen von *Amorphophallus konjak* beschrieben.

Bei den Schleimzellen der *Tubera salep* kann man nun folgendes Phänomen beobachten: Behandelt man kurz mit Wasser imbibierte Zellen mit Alkohol, so kehrt sich das Vorzeichen der Doppelbrechung vom Rande der Zelle her um. Gleichzeitig geht die Quellung zurück. Setzt man wiederum Wasser zu, so erscheint das positive Kreuz erneut. Dieses Spiel kann man mehrfach wiederholen (Abb. 1). Die Doppelbrechung in Alkohol und Wasser ist etwa gleich stark; unter Verwendung der Gipsplatte Rot I. Ordnung

erkennt man in Additionsstellung des Blau II. Ordnung, in Subtraktionsstellung das Gelb I. Ordnung. Der Gangunterschied beträgt also nach grober Schätzung etwa  $100\text{ m}\mu$ .

Wie bereits angedeutet, geht die Änderung der Doppelbrechungsercheinungen mit einer deutlichen Quellung parallel. Wasserentzug durch Alkohol, Isopropanol, 80%ige Essigsäure, Glycerin (nach längerer Einwirkungsdauer oder nach Aufkochen darin), konzentrierte Kalilauge ergibt ein negatives Kreuz; Quellung in Wasser, verdünnter Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure oder Kalilauge läßt das positive Polarisationskreuz hervortreten. Nach einigem Verweilen in den betreffenden Reagenzien kann man durch Zugabe von Wasser oder Alko-

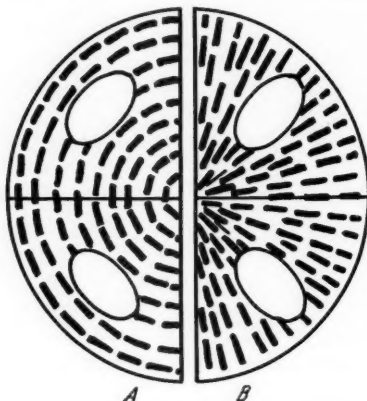


Abb. 1. A Doppelbrechung in Alkohol: Lage der Mannanmicelle. B Doppelbrechung in Wasser: Anordnung der Stärkemicelle.

hol das Vorzeichen der Doppelbrechung wieder ändern. Konzentrierte Schwefelsäure wirkt sowohl stark quellend als auch lösend. Das Quellungsvermögen der Schwefelsäure übertrifft dabei die wasserentziehende Wirkung, denn man beobachtet vor dem Lösen das positive Polarisationskreuz.

Aus den geschilderten Versuchen geht mit genügender Deutlichkeit hervor, daß man es hier nicht mit chemischen Vorgängen (topochemische Reaktionen, Lösungsphänomene) zu tun hat, sondern mit strukturellen Veränderungen, die sich in der Optik äußern.

### 3. Die Eigendoppelbrechung der Bausteine

Die zur Herstellung von Salepschleim benutzten Knollen setzen sich nach Angaben von Wehner (1929, 184) aus 48% Schleim, 27% Stärke, 15% Eiweiß, 1% Zucker und 2% Asche zusammen. Der Schleim selbst besteht zum großen Teil aus dem Polysaccharid Mannan (Pringsheim und Krüger 1932).

Um die Anordnung der Micelle in den Schleimzellen aus der Optik

erschließen zu können, muß die Eigendoppelbrechung der Bausteine bekannt sein. Sie ist zu erhalten, wenn man die Texturdoppelbrechung durch Imbibition aufhebt. Der Imbibitionsversuch bereitet aber bei dem vorliegenden Objekt Schwierigkeiten, da nur hydrophile Flüssigkeiten eindringen. Nach dem Einschluß in Kanadabalsam zeigen die Zellen dieselben polarisationsoptischen Erscheinungen wie trockenes Pulver, die oben beschrieben sind.

Man kann aber das Vorzeichen der Kristallite ermitteln, wenn man die bei der Quellung entstehende Gallerte zu Fäden auszieht oder zusammendrückt. In Gelen stellen sich die stäbchenförmigen Kristallite stets parallel zur Richtung des Zuges und senkrecht zu derjenigen des Druckes ein (nach Schmidt 1934). Die Schleimzellen der *Tubera salep* sind groß genug, um sie mit Hilfe der Pinzette oder Nadel derartig zu beanspruchen. Man beobachtet beim Zug positive Doppelbrechung in bezug auf die Zugrichtung, dagegen negative Anisotropie, wenn man die gequollene Zelle seitlich zusammendrückt. Daraus ist ein positives Vorzeichen der stäbchenförmigen Kristallite zu folgern.

Solchermaßen auf dem Objektträger erzeugte Schleimfäden werden in Alkohol oder getrocknet stärker doppelbrechend. Fügt man Wasser hinzu, so nimmt die Doppelbrechung wieder ab bis zur Isotropie. Negative Doppelbrechung in bezug auf die Länge der Fäden konnte ich bei den Versuchen niemals wahrnehmen, auch nicht unter Benutzung der  $\lambda/4$ -Glimmerplatte, welche sehr kleine Gangunterschiede zu bestimmen gestattet. Zuweilen erkennt man zwischen gekreuzten Nicols an eingetrockneten Schleimen eine feine Querstreifung. Beobachtet man mit einem stärkeren Objektiv, so erkennt man, daß beim Drehen des Objekttisches die hellen Streifen sich verdunkeln, die vorher dunklen aber nun aufleuchten. In geeigneter Stellung kann man mit Hilfe der Gipsplatte erkennen, daß die beiden hellen Zonen diesseits und jenseits des Isotropiestreifens verschiedenes Vorzeichen besitzen, sie weisen steigende und fallende Farben auf. Die Kristallite liegen demnach nicht gleichmäßig parallel zur Längsrichtung eines Fadens, sondern etwas gewellt.

Ausgetrocknete Schleimfäden kann man über Xylol in Kanadabalsam einschließen, ohne daß eine Veränderung des Vorzeichens sichtbar wird. Auch diese Beobachtung spricht für positive Textur- und Eigendoppelbrechung der Kristallite.

#### 4. Die Anordnung der Micelle; Zusammenwirken der Doppelbrechung von Stärke und Mannan

Da der Aufenthalt in Wasser die Doppelbrechung von Schleimfäden aufhebt, Alkohol und höher brechende Medien das positive Vorzeichen nicht verändern, dürfte die Lage des größeren Brechungsindex der in Alkohol liegenden Zelle die Richtung der Kristallite angeben. Diese liegen demnach tangential (in der Aufsicht auf die Zelle). Versuche mit dichroitischen Farbstoffen (Kongorot, Methylenblau oder Jod), die in vielen Fällen direkt auf die Lagerung der Feinbausteine schließen lassen, schlugen fehl.

Die geschilderte Anordnung gibt aber keinen Aufschluß über die Ursache der Entstehung des positiven Polarisationskreuzes in Wasser. Dazu ist vielmehr anzunehmen, daß eine zweite Substanz mit positiver Texturdoppelbrechung in Wasser radial eingelagert ist. Durch die Hydratation ändert sich die Doppelbrechung der tangential gerichteten Micelle und diejenige der radial angeordneten tritt hervor. J a r e t z k y und B e r e c k (1938) haben beobachtet, daß der Schleim der Salepknollen durch „chemische Umwandlung der Stärke ohne sichtbare Strukturveränderung des Stärkekorns“ entsteht. Beim Auskeimen der Pflanze wird der Schleim verbraucht, die Stärke aber bleibt erhalten.

Stärkekörner besitzen Radialtextur mit positivem Polarisationskreuz. Die tangential angeordneten Micellen wären demnach aus Mannan aufgebaut. Mannane können zu kristallinen Bereichen zusammentreten und ergeben dann ein Röntgenspektrum (H e r z o g und G o n e l l 1924). Ihrer chemischen Konstitution als Polysaccharide entspricht das ermittelte positive Vorzeichen ihrer Eigendoppelbrechung.

Die polarisationsoptischen Erscheinungen bei der Quellung der Schleimzellen wären also so zu erklären, daß bei der Hydratation die Mannan-kristallite sich voneinander entfernen und ihre Lagerung mehr und mehr unregelmäßig wird. Die Texturdoppelbrechung nimmt ab und die Doppelbrechung der radial stehenden Stärkemicelle kommt zum Vorschein. Anscheinend sind die Stärkemicelle nicht so dicht gepackt wie im Stärkekorn, so daß sie nach einiger Zeit ebenfalls ihre feinbauliche Ordnung verlieren (Abb. 1).

Obwohl infolge der schnellen Verquellung des Zellinhalts Versuche erfolglos sind, die darauf hinzielen, durch Hydrolyse mit verdünnten Säuren oder mit Hilfe von Fermenten die optisch in Erscheinung tretenden Bausteine der Zelle zu trennen, lassen sich die eben geschilderten Erklärungsversuche durch folgendes Experiment stützen: Man gibt eine kleine Menge Saleppulver in einen Tropfen Wasser und erhitzt auf dem Objektträger bis zum Aufkochen. Die Zellen verquellen dabei sehr rasch und erscheinen fast isotrop. Nun fügt man sofort 96%igen Alkohol dazu. Während die Amylose durch Lösung und Amylopektin durch Verquellen isotrop geworden sind, ordnen sich die Mannane zum Teil infolge der entquellenden Wirkung des Alkohols wieder. Die Zelle erscheint im Polarisationsmikroskop mit schwachem negativem Kreuz. Nunmehr vermag man auch durch Zugabe von viel Wasser keine Umkehr der Doppelbrechung zu erzielen. Wie sich aus parallel durchgeführten Versuchen mit Stärkekörnern, z. B. der Kartoffel, ergibt, kann verquollene Stärke durch Alkohol nicht wieder geordnet werden, die Körner bleiben isotrop.

Damit ist der submikroskopische Bau der Schleimzellen im wesentlichen geklärt. Späteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben, auf welche Weise der Umbau der Stärke im Schleim vor sich geht und wie die Zelle in dem anfangs dicht gepackten Stärkekorn Platz schafft für die tangential-einlagerung des Mannans.

### Zusammenfassung

Der Wechsel des Vorzeichens der Doppelbrechung von in Wasser liegenden Schleimzellen bei Alkoholzugabe gab Anlaß zur Klärung ihres Feinbaues: Tangential gelagerte Mannanmicellen kreuzen sich mit radial verlaufenden Stärkemellen. Durch Behandlung mit heißem Wasser kann man die Doppelbrechung der Stärke aufheben und erhält nach Zugabe von Alkohol die Anisotropie des Mannans.

### Literatur

- Czaja, Th. A., 1954: Praktische Anwendung der Polarisationsmikroskopie in der Pflanzenanalyse. Ber. Oberhess. Ges. Natur- u. Heilkde. 27, 147.
- Frey-Wyssling, A., 1953: Submicroscopic Morphology of Protoplasm. Amsterdam, London, Houston, New York.
- Herzog, R. D., und H. W. Gonell, 1924: Weitere Untersuchungen an Naturstoffen und biologischen Strukturen mittels Röntgenstrahlen. Naturw. 12, 1133.
- Jaretzky, R., und E. Bereck, 1938: Der Schleim in den Knollen von *Orchis purpureus* Huds. und *Platanthera bifolia* (L.) Rchb. Arch. Pharmaz. 276, 17.
- Pringsheim, H., und D. Krüger, 1932: Membranstoffe. In Klein, Hdb. der Pflanzenanalyse, Bd. 3, 2. Teil. Wien 1932.
- Schmidt, W. J., 1934: Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben. In Abderhaldens Hdb. d. biol. Arb.Meth. Abt. V, Teil 10, 435.
- Wehner, C., 1929: Die Pflanzenstoffe, Bd. 1. Jena.



# **Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Zucker und mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Alkalien auf das Pflanzenplasma**

## **III. Mitteilung**

Von

**Hugo Kaho, Hamburg**

Mit 5 Textabbildungen

*(Eingegangen am 21. November 1955)*

Die lebende Substanz der Zellen — das Protoplasma — hat schwach alkalische Reaktion, und sehr schwache alkalische Lösungen geben ihm eine größere Resistenz gegen schädigende Einwirkungen von außen. So fand Lepeschkin (1910), daß die Hitzeagulation des Pflanzenplasmas in schwach alkalischer Lösung bei etwas höherer Temperatur als in neutraler vor sich geht. Da die Eiweißverbindungen den Hauptbestandteil des Plasmas bilden, so ist es verständlich, daß schwach alkalische Lösungen gegen die Hitzegerinnung wirken. Denn versetzt man eine Eiweißlösung mit einer geringen Menge von Alkali, so bleibt das Eiweiß auch beim Kochen klar und die Hitzeagulation unterbleibt.

Größere Alkalimengen zersetzen Eiweiß und zerstören auch das Protoplasma. So z. B. sterben in einer 0,015 *n* NaOH-Lösung die Pflanzenzellen innerhalb von 5–10 Stunden ab.

Ich habe gefunden, daß Zucker und mehrwertige Alkohole gegen giftige Neutralsalze<sup>1</sup> und verschiedene Säuren<sup>2</sup> bei gewissen Versuchsbedingungen bei Pflanzenzellen eine antagonistische Wirkung (a. W.) aufweisen.

In den unten folgenden Versuchen wird die a. W. der Mono-, Disaccharide und mehrwertigen Alkohole gegen Alkalien beim Pflanzenplasma näher untersucht.

Die Versuche wurden mit Flächenschnitten von Rotkohl durchgeführt. In jede Lösung wurden 100–120 kleine, gleich dicke quadratische Schnitte (1–1,5 mm<sup>2</sup>) gelegt und nach gewissen Zeitintervallen herausgenommen, 10 Minuten in Leitungswasser gehalten und in einem ausbalancierten Plasmolytikum plasmolysiert. Alle plasmolysefähigen (bei hypertonen

<sup>1</sup> Diese Zeitschrift, 45, 560 (1956).

<sup>2</sup> Dasselbst, 47, 164 (1956).

Zuckerlösungen deplasmolysefähigen) Zellen galten als lebende (Näheres über diese Methode s. K a h o 1921, 1923, 1933).

Das Anthozyan des Rotkohls ist bekanntlich ein ausgezeichneter Indikator. Es ist für verschiedene Alkaliabstufungen empfindlicher als für Säuregrade. Das Anthozyan des Rotkohls, welches zu diesen Versuchen verwendet wurde, hatte ungefähr pH 7,0. Bei pH 7,1 folgte ein deutlicher Umschlag ins Blau, bei pH 7,2 kam ein schwach grüner Ton zum Vorschein, bei pH 7,6–7,8 eine gelbe Färbung.

Das bedeutet, daß, wenn äußerst kleine und nicht tödliche Mengen von Alkalien in die Zellen eindringen, die Zellen sich blau färben. Solche Zellen plasmolysieren normal und sind sonst unbeschädigt. In Wasser oder bei längerem Stehen kann die blaue Farbe wieder in eine normale zurückgehen, was besonders für Schnitte in Ammoniak- bzw.  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösungen zutrifft.

Bevor wir zu den Versuchen übergehen, möchte ich einen chemischen Prozeß noch kurz erwähnen, der mit den Alkaliwirkungen in einem Zusammenhang steht.

Bekanntlich absorbieren alle Laugen Kohlendioxyd mit der Bildung von Carbonaten.

Bei der Atmung der Schnitte geht das  $\text{CO}_2$  in die Lösung; ferner wird es auch aus der Luft von Laugen absorbiert. Infolgedessen wird ein Teil der  $\text{OH}$ -Ionen während der Versuche chemisch gebunden und die Hydroxyde werden etwas abgeschwächt. So z. B. hat der Kontrollversuch in der Tab. 6 ( $\text{NaOH}$ ) zu Beginn pH 11,5 und nach 5 Stunden pH 11,0. Dies trifft mehr oder weniger für alle Lösungen, die Alkalien enthalten, zu. Da dies in allen Versuchen in gleicher Weise vor sich geht, so wird dadurch in den Endergebnissen nichts Wesentliches geändert.

In den Versuchen färbt sich die Flüssigkeit mit den Schnitten, je nachdem wie schnell die Zellen absterben und Anthozyan ausscheiden, von Grün bis Gelb. Diese Färbung zeigt gewissermaßen an, ob die Zellen schnell oder langsam, massenhaft oder vereinzelt absterben. Daraus kann man im groben Stil die a. W. der Zucker ableiten.

In der Regel färbt sich die Flüssigkeit im Kontrollversuch schon nach 1–2 Stunden grünlichgelb. In den Lösungen mit Lauge und Zucker wird eine schwache gelbe Farbe erst viel später sichtbar. In einigen Fällen bleiben diese Lösungen bis zum Ende der Versuche wasserklar.

Doch muß gesagt werden, daß bei der Herstellung der Schnitte vereinzelt Zellen etwas geschädigt werden und daß sie trotz sorgfältiger Abwaschung in den Zuckerlösungen schneller absterben als die Hauptmasse der Zellen, sowie Anthozyan ausscheiden. Infolgedessen haben auch die Zuckerlösungen mit den noch intakten Zellen oft nach 5–7 Stunden eine sehr schwache grünlichblaue oder gelbliche Farbe.

Die Stärke der Alkalien wurde so gewählt, daß alle Zellen beim Kontrollversuch in ca. 5–10 Stunden abstarben. In einigen wenigen Versuchen konnte diese Bedingung aus verschiedenen Gründen nicht ganz genau eingehalten werden.

Alle Zahlen, die in den Tabellen angegeben sind,

bedeuten den Prozentsatz der lebenden Zellen in je zehn Schnitten.

Die Versuche wurden serienweise und gleichzeitig (jede Serie bei gleichen Außenbedingungen) angestellt.

Die Zucker und Alkohole wurden den Alkalien in substantia zugesetzt.

Alle Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt.

## Versuche

Tabelle 1.

Rotkohl. NaOH ca.  $\frac{1}{75} n$ ; pH 11,5. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{75} n$ (Kontroll- vers.)	do + <sup>1</sup> Maltose					
		0,05 m <sup>2</sup>	0,1 m	0,2 m	0,4 m	0,6 m	0,8 m
		pH 11,2		pH 11,0		pH 10,5	pH 10,0
30 Minuten	90	100	98	100	96	92	85
1 Stunde	90	92	95	97	87	70	55
2 Stunden	52	92	94	95	48	37	37
3 „	35	90	96	95	37	15	17
4 „	30	93	95	92	35	25	27
5 „	7	92	90	93	10	23	25
7 „	0	90	93	92	0	0	0
Mittelwert (%) <sup>3</sup>	43	93	94	92	45	37	35

<sup>1</sup> „do“ bedeutet das Kontrollalkali (hier NaOH) in derselben Konzentration wie beim Kontrollversuch.

<sup>2</sup> Die Konzentration des Zuckers im Gemisch.

<sup>3</sup> Der Mittelwert zeigt die a. W. eines Zuckers bzw. Alkohols schon deutlich an, wenn der Prozentsatz der lebenden Zellen mindestens um 10% höher als der des Kontrollversuches ist, alle Zeitabschnitte der betreffenden Versuchsserie eingerechnet. (In der Tab. 1 sieben Zeitabschnitte.)

Tabelle 2.

Rotkohl. NaOH ca.  $\frac{1}{75} n$ ; pH 11,5. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{75} n$ (Kontroll- vers.)	do + Maltose		do + Laktose		do + Saccharose	
		0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m
		pH 11,2					
1 Stunde	75	98	100	100	100	98	100
2 Stunden	58	92	100	100	100	90	95
3 „	40	97	100	100	95	92	92
4 „	17	95	100	100	100	90	90
5 „	12	92	95	93	100	73	90
6 „	10	90	70	88	85	50	87
7 „	0	75	50	78	75	38	85
8 „	0	35	40	55	92	50	92
10 „	0	32	60	65	85	28	73
Mittelwert (%)	22	78	79	87	92	68	87

Im Kontrollversuch der Tab. 1 kann man mit dem bloßen Auge sehen, daß an den Rändern der Schnitte breite Streifen der Zellen blau sind und in der Mitte die Fläche noch rot ist. Ferner, daß das Alkali konzentrisch in die Schnitte eindringt. Die abgestorbenen Zellen färben sich gelblich. In den hypotonischen Lösungen der Maltose (0,05–0,2 m) ist die Farbe der Schnitte rötlich und fast normal. In den Schnitten kommen nur wenige blaue Zellen vereinzelt vor. Dagegen in den hypertonischen Lösungen der Maltose (0,4–0,8 m) färben sich alle Zellen blau. Die hypotonischen Maltoselösungen zeigen eine ziemlich starke a. W. gegen das Natriumhydroxyd. Alle drei Konzentrationen haben ein gleiches Endergebnis. Die hypertonischen Lösungen wirken dagegen schon gewissermaßen synergetisch. Sie fördern etwas die schädigende Wirkung des Hydroxyds, außer 0,4 m Maltose.

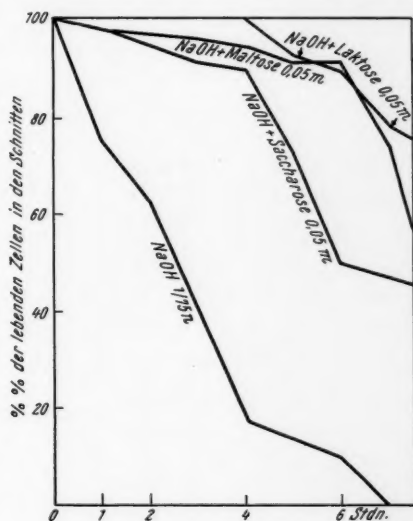


Abb. 1.

Die Tab. 2 stellt einen Vergleich der a. W. dreier Disaccharide gegen Na-Lauge dar. Wir sehen, daß alle drei Zucker eine beachtliche und im allgemeinen ziemlich gleiche Gegenwirkung aufweisen und nur 0,05 m Saccharose etwas mehr beschädigte Zellen und Laktose eine etwas größere a. W. als die anderen Zucker hat (s. auch Abb. 1).

Tabelle 3.

Rotkohl. NaOH ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 11,4. Temp. 22°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{100}$ n (Kontroll- vers.)	do + Glukose					
		0,05 m	0,1 m	0,2 m	0,3 m	0,4 m	0,6 m
		pH 11,2	pH 11,0		pH 10,5		pH 10,0
1 Stunde	85	98	97	100	100	92	87
2 Stunden	70	98	97	100	90	88	78
3 „	45	97	98	100	65	65	65
4 „	45	95	97	100	70	63	60
5 „	50	92	95	98	65	52	45
6,5 „	48	90	92	95	55	58	40
8,5 „	23	68	92	93	50	47	50
11 „	0	77	80	83	58	40	37
Mittelwert (%)	46	89	93	95	69	63	58

Die vorstehende Versuchsserie zeigt die a. W. einer Hexose gegen das Natriumhydroxyd (Tab. 3).

In der reinen NaOH-Lösung (Kontr.) werden die Randzellen bei den Schnitten in 1 Stunde bläulich und später färben sich alle Zellen blau.

Tabelle 4.

Rotkohl. NaOH ca.  $\frac{1}{70}$  n; pH 11,5. Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{70}$ n (Kontroll- vers.)	do + Xylose				do + Arabinose	
		0,05 m	0,1 m	0,2 m	0,4 m	0,1 m	0,2 m
		pH 11,2		pH 11,0	pH 10,5	pH 11,2	pH 11,0
1 Stunde	70	95	100	100	95	98	100
2 Stunden	52	95	97	95	83	97	98
3 „	47	90	92	83	75	95	95
5 „	55	73	75	80	73	97	95
6 „	38	57	60	70	70	95	90
8 „	25	55	65	67	53	95	92
10 „	5	65	60	75	57	93	75
23 „	0	12	48	60	40	95	80
Mittelwert (%)	36	68	75	79	68	96	91

Dieser Farbumschlag zeigt, daß sehr kleine, noch nicht tödliche Mengen des Natriumhydroxyds in die Zellen eingedrungen sind. Abgestorbene Zellen färben sich grün.

Die Schnitte in 0,05–0,2 m Glukose behalten bis zum Ende der Versuche, abgesehen von einigen wenigen beschädigten Zellen, die blau sind, eine fast

Tabelle 5.

Rotkohl. NaOH ca.  $\frac{1}{70}$  n; pH 11,5. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{70}$ n (Kontroll- vers.)	do + Erythrit			do + Sorbit		
		0,05 m	0,1 m	0,2 m	0,05 m	0,1 m	0,2 m
		pH 11,5					
1,5 Stunden	85	87	92	83	97	98	95
3 „	75	85	87	80	95	87	95
5 „	30	88	72	68	90	92	92
7 „	12	60	58	38	60	60	62
9 „	15	27	30	40	48	55	45
12 „	0	10	27	35	10	20	45
Mittelwert (%)	36	59	61	57	67	69	72

normale rotilla Färbung. Diese hypotonischen Glukoselösungen weisen eine größere a. W. gegen das NaOH auf.

Die Schnitte in 0,3–0,6 m Glukose haben verhältnismäßig mehr blaue, schwerbeschädigte Zellen. Die a. W. dieser Glukoselösungen ist viel schwächer.



In der Versuchsserie der Tab. 4 ist die a. W. der Pentosen gegen NaOH gezeigt. In den Kontrollschnitten kommen schon nach 2 Stunden viele blaue Zellen zum Vorschein. Dieselben treten in allen Xylolesschnitten und in 0,1 m Arabinose erst nach 6 Stunden auf. In 0,2 m Arabinose werden während des Versuches nur wenige blaue Zellen sichtbar.

Tabelle 6.  
*Rhodo discolor*. NaOH ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 11,4. Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{100}$ n (Kontroll- vers.)	do + Glukose			do + Laktose		
		0,06 m	0,12 m	0,18 m	0,06 m	0,12 m	0,18 m
		pH 11,0	pH 10,75	pH 10,5	pH 11,0	pH 10,5	
1 Stunde	90	95	100	100	100	100	100
2 Stunden	50	75	92	95	93	98	100
3 „	12	25	42	43	45	40	68
4 „	0	7	17	28	7	12	45
5 „	0	0	10	23	0	8	25
Mittelwert (%)	30	40	52	58	49	51	68

Die beiden Pentosen wirken gegen die Na-Lauge deutlich antagonistisch, die Arabinose stärker als die Xylose.

In den Lösungen von Erythrit und Sorbit ist der Farbumschlag bei vielen Zellen schon in der ersten Stunde bemerkbar, bei Erythrit etwas mehr als bei Sorbit (Tab. 5). Das Alkali dringt in diesen Versuchen etwas

Tabelle 7.  
Rotkohl. KOH ca.  $\frac{1}{100}$  n; pH 11,5. Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	KOH $\frac{1}{100}$ n (Kontroll- vers.)	do + Maltose		do + Laktose		do + Saccharose	
		0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m
		pH 11,0		pH 10,6			
1 Stunde	90	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	85	95	100	100	100	85	95
3 „	85	95	100	100	100	90	100
4 „	90	95	98	100	100	92	97
7 „	92	95	97	100	100	83	95
9 „	70	82	92	100	100	78	95
23 „	63	73	77	93	98	45	82
Mittelwert (%)	82	91	95	99	100	82	95

schneller in die Zellen ein als in Gegenwart von Pentosen. Die a. W. der Alkohole gegen das Natriumhydroxyd ist auch dementsprechend etwas schwächer als die der Pentosen, und zwar beim Erythrit geringer als beim Sorbit.

Es war interessant, auch einige Versuche über die a. W. außer Rotkohl mit einer anderen Pflanze zu machen. Die Tab. 6 zeigt eine Versuchsreihe

mit *Rhoeo discolor*. Diese Pflanze eignet sich nicht so gut wie Rotkohl für diese Versuche, und es wurde deshalb nur eine Serie angestellt. Die Versuche wurden in derselben Weise wie mit Rotkohl mit einem Mono- und

Tabelle 8.

Rotkohl. KOH ca.  $\frac{1}{50} n$ ; pH 11,5. Temp. 25°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	KOH $\frac{1}{50} n$ (Kontroll- vers.)	do + Glukose				
		0,02 m	0,06 m	0,1 m	0,2 m	0,3 m
		pH 11,5	pH 11,0			
1 Stunde	95	98	100	100	100	100
2 Stunden	92	93	98	100	100	100
3 „	70	82	98	100	100	100
4 „	52	67	97	98	100	100
5 „	0	38	90	95	95	92
7 „	0	0	48	53	97	82
Mittelwert (%)	51	63	88	91	99	96

Disaccharid durchgeführt. Beide Zucker zeigen eine schwache a. W. gegen das Natriumhydroxyd, die bei der Glukose etwas geringer als bei der Laktose ist.

Tabelle 9.

Rotkohl. LiOH ca.  $\frac{1}{50} n$ ; pH 11,5.<sup>1</sup> Temp. 18°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	LiOH $\frac{1}{50} n$ (Kontroll- vers.)	do + Maltose			do + Saccharose		
		0,05 m	0,1 m	0,2 m	0,05 m	0,1 m	0,2 m
1 Stunde	95	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	65	98	100	95	100	100	97
3 „	35	97	100	100	97	98	100
4 „	15	98	100	100	95	98	100
5 „	0	95	98	97	88	95	100
6 „	0	97	100	98	65	87	73
8 „	0	92	97	95	24	45	92
10 „	0	90	97	95	0	20	75
24 „	0	83	90	97	0	0	50
Mittelwert (%)	23	94	98	97	63	71	87

<sup>1</sup> Wo nichts anderes gesagt ist, bezieht sich pH auf alle in einer Versuchsreihe verwendeten Lösungen.

Das Kaliumhydroxyd dringt etwas schneller als NaOH in die Zellen ein (Tab. 7). Im Vergleich zu den mit Natriumhydroxyd gemachten Versuchen geht in den Zellen der Farbumschlag bei Kaliumhydroxyd schneller vor sich. Die Zellen nehmen eine blaue Färbung an. Nach 23 Stunden schlug die blaue Färbung in den lebenden Zellen allmählich in rosa bzw. in eine

rötliche (ungefähr normale) um. In 0,05 m Maltose und Saccharose behielten die lebenden Zellen ihre blaue Farbe noch bei.

Die a. W. der Disaccharide gegen die K-Lauge ist auch in dieser Versuchsreihe unverkennbar. Bezüglich dieser Eigenschaft steht die Laktose an der Spitze, ihr folgen Maltose und Saccharose. 0,05 m Saccharose hat hier keine a. W.

In den vorliegenden Versuchen (Tab. 8) tritt die a. W. der Glukose sehr deutlich hervor. Das Zunehmen dieser Wirkung mit der Vergrößerung der Stärke des Monosaccharids ist gut ersichtlich: bei 0,02 m Glukose ist der Mittelwert der lebenden Zellen 68%, bei 0,06 m 88%, bei 0,1 m 91%, bei 0,2 m 99%, bei 0,3 m (grenzplasmolytischer Wert bzw. schwach hypertonisch) 96%.

Das Lithiumhydroxyd dringt in die Kontroll-schnitte von den Rändern aus konzentrisch in die Zellen ein (Tab. 9). Schon nach 1 Stunde bildet sich an den Rändern ein blauer Saum, der allmählich an Breite zunimmt. Die blauen Zellen nehmen eine grüne Farbe an und sterben ab.

In 0,2 m Saccharose- und allen Maltoselösungen sieht man nur wenige blaue Zellen, in 0,05 m und 0,1 m Saccharose aber etwas mehr.

Beide Disaccharide weisen eine ziemlich starke a. W. gegen das Lithiumhydroxyd auf, die bei der Saccharose schwächer als bei der Maltose ist (s. auch Abb. 2).

Die in der Tab. 10 dargestellten Versuche sind Ende Januar angestellt worden. Obwohl Rotkohl sich im Winter gut aufbewahren läßt, zeigen die Versuche, daß die Widerstandskraft des Protoplasmas doch merklich nachgelassen hat, denn die Schnitte werden in den Zuckerlösungen schneller als gewöhnlich blau. Die Versuche sind mit derselben Konzentration des Lithiumhydroxyds wie in der Tab. 9 angestellt worden und man kann die a. W. der Maltose von 0,05 m und 0,1 m in beiden Fällen vergleichen. 0,01 m der Maltose und Raffinose ist hier als Grenzkonzentration der a. W. zu betrachten. Unterhalb dieser Grenze wird die a. W. schon schwer erkennbar. — Die Maltose und Raffinose weisen in diesen Versuchen eine schwächere a. W. gegen das Lithiumhydroxyd auf. Merkwürdig ist dabei, daß die Raffinose eine geringere a. W. als die Maltose hat.

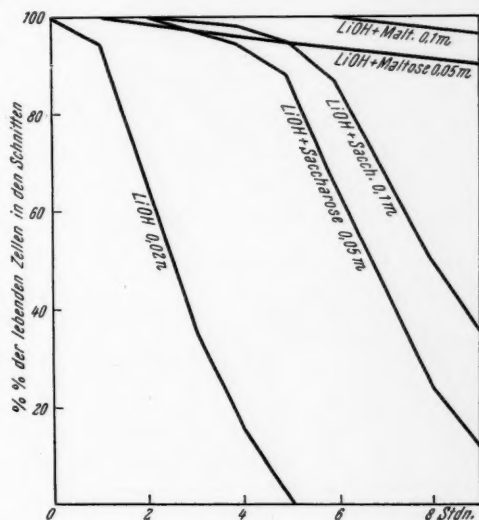


Abb. 2.

Die Versuche mit Calciumhydroxyd zeigen in bezug auf das Pflanzenplasma einen hohen Giftigkeitsgrad dieser Lauge (Tab. 11). Die Schnitte sterben schon nach 2½ Stunden ab. Bemerkenswert ist auch die starke a. W. der Laktose gegen das Calciumhydroxyd.

Tabelle 10.  
Rotkohl. LiOH ca.  $\frac{1}{50}$  n; pH 11,5. Temp. 17°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	LiOH $\frac{1}{50}$ n (Kontroll- vers.)	do + Maltose			do + Raffinose		
		0,01 m	0,05 m	0,1 m	0,01 m	0,05 m	0,1 m
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	62	80	97	98	90	93	95
3 „	23	63	93	90	60	65	67
4 „	10	42	80	85	43	36	53
5 „	0	12	45	52	20	22	25
6 „	0	0	25	23	10	5	10
8 „	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert (%)	28	42	63	64	46	46	50

Die a. W. der Laktose hat sich in den Versuchen mit Laugen im allgemeinen als die intensivste erwiesen.

Im gegebenen Falle hat vermutlich das zweiwertige Kation einen besonderen Einfluß.

Tabelle 11.  
Rotkohl. Ca(OH)<sub>2</sub> ca.  $\frac{1}{40}$  n; pH 11,5. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Ca(OH) <sub>2</sub> $\frac{1}{40}$ n (Kontroll- vers.)	do + Laktose				
		0,01 m	0,03 m	0,06 m	0,1 m	0,2 m
30 Minuten	85	100	100	100	100	100
1 Stunde	68	100	100	100	100	100
1,5 Stunden	55	92	100	100	100	100
2 „	20	65	100	100	100	100
2,5 „	15	63	100	100	100	100
3 „	0	50	100	100	100	100
5 „	0	30	100	100	100	100
7 „	0	12	65	85	90	100
9 „	0	7	32	60	90	98
22 „	0	0	0	50	90	95
Mittelwert (%)	23	52	80	89	97	99

Die Laktose erschwert das Permeieren des Calciumhydroxyds in die Zellen. Die a. W. wächst in diesen Versuchen mit der Vergrößerung der Konzentration der Laktose kontinuierlich an.

Die Tab. 12 zeigt eine vergleichende a. W. dreier Disaccharide gegen das Calciumhydroxyd. Die Zellen sterben schon in 5 Stunden im reinen Calciumhydroxyd ab. In Gegenwart von Disacchariden sind nach 21 Stunden

Tabelle 12.

Rotkohl.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ca.  $1/45$  n; pH 11,5. Temp. 22°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ $1/45$ n (Kontroll- vers.)	do + Maltose		do + Laktose		do + Saccharose	
		0,08 m	0,16 m	0,08 m	0,16 m	0,08 m	0,16 m
		pH 11,0					
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	65	100	100	100	100	100	100
3 „	25	100	100	100	100	92	98
4 „	12	100	100	100	100	85	93
5 „	0	100	100	100	100	83	98
7 „	0	100	100	100	100	80	96
21 „	0	80	100	100	100	78	95
40 „	0	8	50	48	68	37	65
Mittelwert (%)	25	86	94	93	96	82	93

noch ca. 80–100% der Zellen am Leben. Sogar nach 40 Stunden ist, von zwei Fällen abgesehen, mehr als die Hälfte der Schnitte am Leben. Die a. W. der Zucker gegen das  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ist auch in diesen Versuchen sehr stark.

Im allgemeinen sieht man in den Schnitten wenig blaue Zellen; nur in

Tabelle 13.

Rotkohl.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ca.  $1/40$  n; pH 11,5. Temp. 23°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ $1/40$ n (Kontroll- vers.)	do + Arabinose	do + Xylose	do + Sorbitose	do + Mannose	do + Laktose	do + Raffinose
		0,06 m					
1 Stunde	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	65	100	100	100	100	100	100
3 „	47	100	100	100	100	100	100
4 „	35	100	100	100	100	100	95
5 „	28	93	100	100	100	100	90
6 „	10	78	100	100	100	100	64
7 „	0	38	88	98	97	98	45
9 „	0	35	67	93	90	92	25
24 „	0	10	68	90	90	90	18
Mittelwert (%)	31	73	91	98	97	98	71

den Saccharoselösungen kommen sie in den Schnitten öfter vor. — Die stärkeren Zuckerlösungen zeigen in dieser Versuchsserie auch eine etwas intensivere a. W.

Ein Vergleich der a. W. aller Zuckerarten gegen das Calciumhydroxyd



zeigt, daß sie alle eine beachtliche a. W. auslösen (Tab. 13). Dabei haben die Raffinose und die Arabinose eine ungefähr gleich starke Wirkung, die zwei

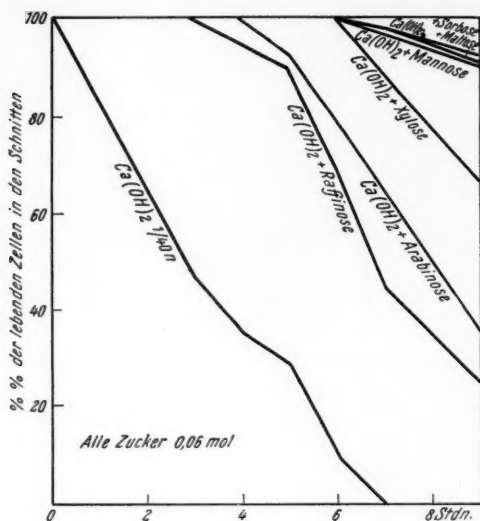


Abb. 3.

Monosaccharide und das Disaccharid wirken etwas stärker antagonistisch, die Xylose nimmt eine Mittelstellung ein. — Die Kontrollschnitte haben nach 2 Stunden an den Rändern viele blaue Zellen. In den anderen Lösungen haben die Zellen eine normale Farbe, ausgenommen die Raffinose, in der die Zellen eine rötlich-violette Färbung angenommen haben, die in den anderen Zuckerlösungen erst nach 6 Stunden auftritt (siehe auch Abb. 5).

Es wurden noch in der Weise Versuche ausgeführt, daß die Schnitte

eine Zeit in reinen Zuckerlösungen gehalten und nachher in eine reine Hydroxydlösung übertragen wurden. Eine solche Vorbehandlung der Schnitte gibt ihnen einen größeren Widerstand gegen Laugen.

Tabelle 14.

Rotkohl. NaOH ca.  $\frac{1}{70}$  n; pH 11,5. Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	NaOH $\frac{1}{70}$ n (Kontroll- vers.)	Die Schnitte 15 Minuten vorbehandelt mit:					
		Laktose			Fruktose		
		0,1 m	0,2 m	0,3 m	0,1 m	0,2 m	0,3 m
30 Minuten	90	100	100	100	98	98	100
1 Stunde	75	98	98	98	92	95	98
1,5 Stunden	58	95	95	95	73	93	95
2 „	50	95	95	95	80	95	87
3 „	8	50	92	92	10	23	98
4 „	0	10	50	68	0	0	80
5 „	0	0	0	35	0	0	57
Mittelwert (%)	40	64	76	83	50	58	80

In der Tab. 14 ist eine Versuchsreihe mit den vorbehandelten Schnitten dargestellt. Die mit Laktose und Fruktose 15 Minuten vorbehandelten Schnitte zeigen eine unverkennbare a. W. gegen das Natriumhydroxyd. Die

mit stärkeren Zuckerlösungen vorbehandelten Schnitte zeigen auch deutlich eine entsprechend größere Resistenz gegen die Lauge (s. Abb. 4).

Auch gegen das Calciumhydroxyd sind die Schnitte durch die Vorbehandlung (15 Min.) mit Maltose und Saccharose widerstandsfähiger geworden (Tab. 15). Die a.W. ist in diesem Fall im allgemeinen etwas geringer als in der vorhergegangenen Versuchsreihe (Tab. 14), insbesondere bei den mit Saccharose vorbehandelten Schnitten.

Die Tab. 16 zeigt eine Versuchsserie mit Ammoniumhydroxyd. Da sich aber nur ein geringer Bruchteil der gelösten  $\text{NH}_3$ -Moleküle mit Wasser umsetzt, haben wir es eigentlich mit der wässrigen Lösung von Ammoniak zu tun. Ammoniak dringt sehr schnell in die Zellen ein und bewirkt einen Farbumschlag in Grünlichblau. Beim Kontrollversuch (pH 10,5) bildet sich an den Rändern der Schnitte ein grün-

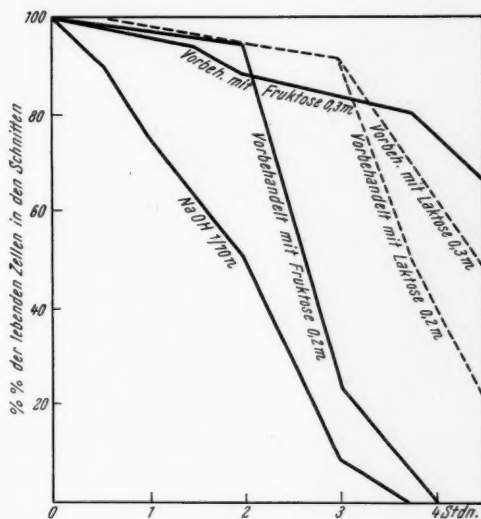


Abb. 4.

Tabelle 15.

Rotkohl.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ca.  $\frac{1}{50}$  n; pH 11,4. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ $\frac{1}{50}$ n (Kontroll- vers.)	Die Schnitte 15 Minuten vorbehandelt mit:					
		Maltose			Saccharose		
		0,1 m	0,2 m	0,3 m	0,1 m	0,2 m	0,3 m
1 Stunde	92	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	68	98	100	100	100	100	95
3 „	43	68	95	90	87	88	50
4 „	25	45	47	65	40	38	37
5 „	17	43	33	55	25	40	30
6 „	23	50	40	52	45	45	40
8 „	20	45	35	50	20	32	27
11 „	17	63	40	40	28	20	25
Mittelwert (%)	38	64	61	69	56	58	50

licher Saum, der an Breite sehr schnell zunimmt. Ammoniak dringt konzentrisch in die Zellen der Schnitte ein, bis die ganze Fläche grünlichblau geworden ist. Durch diesen Farbumschlag des Anthozyans werden die Zellen

nicht getötet. In Gegenwart von Zuckern wird das Eindringen des  $\text{NH}_3$  verlangsamt, besonders in Gegenwart von Disacchariden. Die Zellen nehmen im letzteren Fall eine bläulichgrüne Farbe an, die mit der Zeit bläu-

Tabelle 16.  
Rotkohl.  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; pH ca. 10,5. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	$\text{NH}_4\text{OH}$ pH ca. 10,5 (Kontrollvers.)	do + Erythrit	do + Xylose	do + Arabinose
		0,2 m		
1 Stunde	100	100	100	100
2 Stunden	90	93	95	90
4 „	70	87	87	65
5 „	62	90	82	60
6 „	50	75	75	51
7 „	30	42	65	50
8 „	0	0	50	37
Mittelwert (%)	57	64	69	65

licher wird. Bei Plasmolyse ist die Farbe der Zellen tiefblau, bei der Deplasmolyse wird sie rötlich. Diese Farbumschläge zeigen das allmähliche Entweichen des Ammoniaks aus dem Zellsaft. Zucker und mehrwertige Alkohole wirken nur bei geeigneten Konzentrationen gegen das  $\text{NH}_3$  deutlich antagonistisch. In den vorliegenden Versuchen zeigt nur die Xylose eine

Tabelle 17.  
Rotkohl. Methylamin ca. 1/10%; pH 11,0. Temp. 22°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Methyl- amin 1/10 % (Kontroll- vers.)	do + Saccharose		do + Maltose		do + Raffinose	
		0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m	0,05 m	0,1 m
5 Stunden	100	100	100	100	100	100	100
9 „	52	82	92	93	98	90	80
12 „	35	52	70	85	90	55	50
16 „	5	47	63	68	70	42	45
20 „	0	38	35	47	60	28	43
24 „	0	32	32	40	50	22	24
Mittelwert (%)	32	59	65	72	78	56	57

schwache a.W. gegen das  $\text{NH}_3$ . Die der Arabinose und des Erythrits liegt im Bereich des Versuchsfehlers.

Auch Methylamin, das in seinem chemischen Verhalten dem Ammoniak sehr ähnlich ist, dringt schnell in die Zellen ein und bewirkt in ihnen einen Farbumschlag (blau, grün). Nach einigen Stunden kommt in den lebenden Zellen die normale rote Farbe wieder zurück; in verschiedenen Zellen in ver-

schiedener Zeit. Dieses weist auf eine Neutralisierung des Zellsaftes in den Zellen, wahrscheinlich durch Verflüchtigung des Methylamingases.

Es ist nicht leicht, mit Methylamin Versuche anzustellen. Man muß zuerst viele Vorversuche machen, um eine geeignete Konzentration zu finden, in welcher die a. W. der Zucker am besten auftritt.

Tabelle 18.

Rotkohl. Methylamin ca.  $\frac{1}{7}\%$ ; pH 11,0. Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Methyl- amin $\frac{1}{7}\%$ (Kontroll- vers.)	do + Xylose	do + Glukose	do + Fructose	do + Mannose	do + Sorbitose	do + Sac- charose
		0,1 m					
2 Stunden	100	100	100	100	100	100	100
4    "	45	100	100	100	100	100	100
5    "	42	90	100	93	100	95	60
6    "	35	94	95	98	98	95	34
7    "	18	97	80	85	92	93	30
8    "	12	95	85	92	93	92	37
9    "	0	93	65	80	95	55	20
Mittelwert (%)	36	96	89	92	97	90	54

In der vorliegenden Serie (Tab. 17) sehen wir eine deutliche, nicht besonders intensive a. W. dreier Disaccharide gegen das Methylamin: Raffinose < Saccharose < Maltose.

Tabelle 19.

Rotkohl. Trimethylamin ca.  $\frac{7}{10}\%$ ; pH 11,0. Temp. 20°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	Trimethyl- amin $\frac{7}{10}\%$ (Kontroll- vers.)	do + Xylose		do + Erythrit		do + Sorbit	
		0,04 m	0,09 m	0,04 m	0,09 m	0,04 m	0,09 m
30 Minuten	95	100	100	100	100	100	100
1 Stunde	92	95	95	97	100	95	100
1,5 Stunden	70	90	92	92	90	93	90
2    "	45	80	87	80	93	95	82
2,5   "	15	65	78	67	83	80	75
3    "	0	40	65	50	50	52	35
3,5   "	0	27	50	40	35	30	28
4    "	0	15	20	13	28	17	8
Mittelwert (%)	40	65	73	67	72	70	65

In der Tab. 18 ist hauptsächlich die Gegenwirkung der Monosaccharide gegen das Methylamin dargestellt. Wie ersichtlich, ist die a. W. von vier Hexosen und einer Pentose, abgesehen von kleineren Differenzen, ungefähr dieselbe, und zwar ziemlich intensiv. — Die Saccharose weist dagegen eine viel schwächere a. W. als die Monosaccharide auf (Abb. 5).

Die Versuche mit Trimethylamin verliefen in derselben Weise wie die mit Methylamin (Tab. 19).

Tabelle 20.

Rotkohl.  $K_2CO_3$  0,2 n; pH 11,5. Temp. 21°.

Einwirkungs- zeit der Lösungen	$K_2CO_3$ 0,2 n (Kontroll- vers.)	do +	do +	do +	do +	do +
		Xylose	Fructose	Saccharose	Maltose	Laktose
		0,1 m				
1 Stunde	100	100	100	100	100	100
2 Stunden	55	85	60	75	95	90
3 „	53	65	50	75	78	52
5 „	60	70	72	90	95	53
7 „	38	82	77	78	75	68
9 „	30	63	65	75	80	70
11 „	10	47	50	50	48	50
12 „	0	43	32	60	52	50
Mittelwert (%)	43	68	63	74	78	66

Die Alkohole und Xylose, die bei diesen Versuchen in schwächeren Konzentrationen angewendet wurden, zeigen eine geringere a. W. gegen dieses

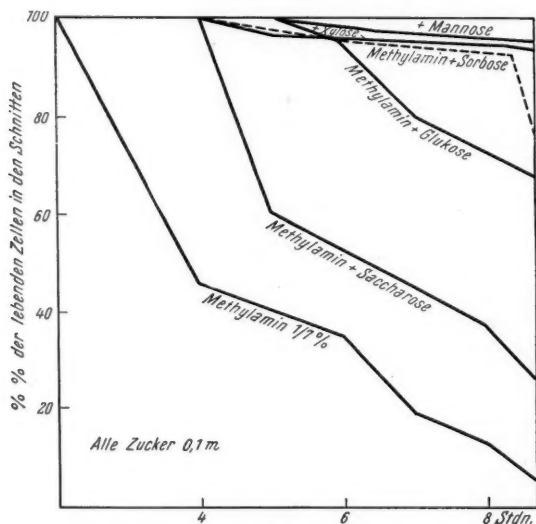


Abb. 5.

Amin. Die a. W. der Xylose, des Erythrits und Sorbits gegen Trimethylamin ist durch diese Versuche grundsätzlich erwiesen.

$K_2CO_3$  ist ein Salz einer starken Base und schwachen Säure. Infolgedessen ist es in der Lösung hydrolytisch gespalten und enthält OH-Ionen.



Die Schnitte sterben in 12 Stunden in Kaliumkarbonat ab. Von allen Zuckern wirkten die Saccharose und die Maltose am stärksten antagonistisch; die Xylose, Fruktose und Laktose dagegen etwas schwächer.

### Schlußbemerkungen

Die in dieser Arbeit kurz dargestellten Versuche haben den Beweis erbracht, daß Mono-, Disaccharide und Raffinose sowie die polyvalenten Alkohole Erythrit und Sorbit gegen verschiedene, fürs Pflanzenplasma giftige Konzentrationen der Alkalien eine deutliche antagonistische Wirkung aufzeigen. Diese antagonistische Wirkung kommt dadurch zustande, daß die Zucker und Alkohole die Oberflächenschicht des Pflanzenplasmas verfestigen und den Eintritt von Alkalien in das Plasma verhindern bzw. erschweren. Alle theoretischen Erwägungen, die sich auf diese Frage beziehen, habe ich in meiner I. Mitteilung<sup>3</sup> diskutiert und verweise deshalb auf diese Arbeit.

Die a. W. des Zuckers gegen Alkali kann man im Mikroskop gut beobachten, wenn man gleichzeitig zwei kleine viereckige, gleich dicke Schnitte auf demselben Objektglas, den einen Schnitt (I.) in einen Tropfen NaOH 0,1 *n* und den anderen (II.) in dieselbe Lauge, mit etwas feinem Rohrzucker versetzt, legt.

Nach 5–10 Minuten ist mit dem bloßen Auge zu sehen, daß der I. Schnitt einen grünen Streifen an den Rändern bekommt, der II. Schnitt seine Farbe aber nicht geändert hat.

Im Mikroskop sehen wir, daß die Zellen zuerst blau und dann grün werden. Nach 30–40 Minuten ist der grüne Randstreifen breiter geworden, während beim Schnitt II die ganze Fläche, außer einigen vereinzelt blauen Zellen, normal rot geblieben ist. Werden die beiden Schnitte danach in einem starken Plasmolytikum (1–1,5 *n*) plasmolysiert, so plasmolysieren beim II. Schnitt alle Zellen, beim I. alle, außer den grünen Randzellen, die vollständig zerstört sind. Bei der Deplasmolyse (die Rotkohlzellen sind so widerstandsfähig, daß sie auch eine Deplasmolyse ertragen!) sehen wir, daß beim I. Schnitt ein breiter Randstreifen von leeren Zellen vorhanden ist (ungefähr die Hälfte der Schnittfläche), die übrigen Zellen sind intakt geblieben und haben eine lila Farbe. Der Schnitt II hat aber alle Zellen rot und intakt.

Wünscht man die oben beschriebene Beobachtung schneller durchzuführen, so muß man eine stärkere Lauge nehmen, am besten NaOH 0,2 *n*. In diesem Fall genügt es, wenn man die beiden Schnitte nur 5 Minuten auf dem Objektglas hält und danach in einem starken, ausgeglichenen Plasmolytikum plasmolysiert.

Man sieht zu Beginn der Beobachtung sehr deutlich, wie die Lauge (ohne Zucker oder Alkohol) ziemlich schnell von den Rändern des Schnittes konzentrisch in die Zellen eindringt und in 5 Minuten etwa die Hälfte oder auch alle Zellen zerfrißt. — In dem anderen Schnitt auf demselben Objektglas (je nach dem Zucker oder Alkohol) dringt die Lauge verhältnismäßig wenig in die Zellen ein. So z. B. alle Mono- und Disaccharide<sup>4</sup> halten in dieser Zeit das Eindringen der Lauge in die Zellen fast 100%ig zurück. Erythrit, Sorbit und Mannit unterdrücken das Eindringen in geringerem Maße.

<sup>3</sup> Diese Zeitschrift, 45, 560 (1956).

<sup>4</sup> In substantia zugesetzt.

### Kurze Zusammenfassung

1. Es wurde die antagonistische Wirkung der Zucker und mehrwertigen Alkohole gegen Alkalien beim Pflanzenplasma untersucht. Versuchspflanze war Rotkohl.

2. Als Alkalien wurden verwendet: Natrium-, Kalium-, Lithium-, Calcium- und Ammoniumhydroxyd (bzw. Ammoniaklösung); ferner noch Methylamin, Trimethylamin und Kaliumkarbonat mit einer OH-Konzentration pH 10,5—11,5.

3. Als antagonistisch wirkende Verbindungen kamen zur Verwendung die Pentosen: Xylose und Arabinose; die Hexosen: Fruktose, Sorbose, Glukose und Mannose; die Disaccharide: Maltose, Saccharose, Laktose; das Trisaccharid Raffinose (Melitose); mehrwertige Alkohole: Erythrit und Sorbit.

4. Alle genannten Stoffe setzen die Permeabilität des Plasmas für Alkalien herab und verhindern ihr Eindringen in die Zellen.

5. Die Verminderung der Permeabilität des Plasmas kommt dadurch zustande, daß die antagonistisch wirkenden Stoffe die Plasmaoberflächenschicht verdichten, vermutlich durch die Dehydratation der Plasmaoberflächenlipide.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren freundliche Unterstützung die vorliegende Arbeit ermöglicht wurde, spreche ich an dieser Stelle meinen tiefempfundenen Dank aus.

Mein herzlicher Dank gebührt auch Professor Dr. W. Mevius, Direktor des Staatsinstituts für allgemeine Botanik in Hamburg, der mir in seinem Institut freundlicherweise einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte.

### Literatur

- Kaho, H., 1923: Über die physiologische Wirkung der Neutralsalze usw. Acta et Comm. Univ. Dorpat A V 4.  
— 1933: Das Verhalten der Pflanzenzelle gegen Schwermetallsalze. Planta 18.  
Lepeschkin, W. W., 1910: Zur Kenntnis der Plasmamembran. I. und II. Ber. dtsch. bot. Ges. 28, 98 u. 383.  
— Kolloidchemie des Protoplasmas, 2. Aufl.

# Untersuchungen über die Protein- und Nukleinsäurefraktionen des Zellkernes<sup>1</sup>

Von

**W. D. Weinmann**

Aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität Mainz

(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. November 1955)

Der chemischen Natur der Zellkernverbindungen wird großes Interesse entgegengebracht, da sie die Vererbungssubstanzen sowie die Träger des umfangreichen Multienzymsystems darstellen müssen. Die histochemischen Untersuchungen brachten jedoch nur auf dem Gebiet der Nukleinsäuren wesentliche Fortschritte, und zwar durch die Arbeiten von Brachet [4], der die Ribonukleinsäure (RNS) im Nukleolus nachweisen konnte, und von Caspersson [6 und 7], der den Nukleinsäuregehalt des Kernes bestimmte und die Proteine nach ihrem Gehalt an aromatischen Aminosäuren einteilen konnte. Die eigentliche Aufklärung begann erst mit der chemischen Fraktionierung und anschließenden Charakterisierung der Verbindungen. Allerdings werden auf diesem Wege Fraktionen erhalten, die sich nicht direkt mit den altbekannten histologischen Strukturen vergleichen lassen.

Seit den Arbeiten von Miescher [20] ist das Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Nukleoprotein mit dem Histon als Proteinkomponente bekannt und durch die Untersuchungen von Mirsky und Pollister sowie Mirsky und Ris [21 und 23] konnte die Existenz eines DNS-Histon-Komplexes endgültig bewiesen werden. Umstritten ist jedoch noch die Existenz des Nichthistons oder Tryptophanproteins. Von Stedman und Stedman [27] wurde 1943 auf Grund von Unstimmigkeiten bei der Berechnung des Nukleoproteids aus den Nukleinsäure- und Histonwerten eine zusätzliche Fraktion angenommen und als Nichthiston bezeichnet. Sie charakterisierten das Protein als säureunlöslich. Mirsky und Pollister [21] stellten 1946 in ihrem Nukleoprotein einen Tryptophangehalt fest, der durch das Histon nicht zu erklären war und nahmen daher gleichfalls eine weitere

<sup>1</sup> Dissertation Universität Mainz, 1954.

Proteinfraktion an, die sie Tryptophanprotein nannten. Später kennzeichneten sie die Fraktion als unlöslich in Säuren und Alkalien. Zbarskij und Debow [33] dagegen fanden in einem gereinigten Nukleoprotein kein Tryptophan und vermuteten, daß die Tryptophanproteinfraktion durch Verunreinigungen mit Saurem Protein, dessen Tryptophangehalt sie nachweisen konnten, vorgetäuscht würde.

Als erste neuere Proteinfraktion wurde von Mayer und Gulik [19] das Saure Protein gefunden, das in alkalischen Medien in Lösung geht und bei pH 6 ausgefällt werden kann. In der Folge konnte diese Fraktion von mehreren Untersuchern, so von Belozersky (zit. bei Zbarskij und Debow) 1948/49, von Stedman und Stedman [26] 1950 und von Wang, Kirkham, Dallan, Mayer und Thomas [32] 1950, wiedergefunden werden. Der verbleibende unlösliche Rückstand nach Herauslösung des Sauren Proteins wird ganz allgemein als Restprotein bezeichnet.

Die elektrophoretische Untersuchung beschränkte sich auf das Nukleoprotein (Gaydusek [11] und Frick [10]) und lieferte widersprechende Ergebnisse bezüglich der Zahl der Komponenten dieser Fraktion (zwei oder drei), je nachdem auf welchem Wege das Nukleoprotein gewonnen worden war (mit 1 m NaCl oder mit dest. Wasser). Allgemein wurde angenommen, daß mehr oder weniger alle diese Fraktionen aus Unterfraktionen bestehen, und von Stedman und Stedman konnte durch fraktionierte Fällung des Histons mit Alkohol eine Auftrennung in zwei bis drei Hauptfraktionen und einige Nebenfraktionen erreicht werden.

Wenn man von der Arbeit von Zbarskij und Debow absieht, liegen keine Untersuchungen mit dem Ziel einer vollständigen Fraktionierung der Zellkernproteide vor, in ihrem Mittelpunkt standen stets die Gewinnung, Reinigung und chemische Charakterisierung einzelner Fraktionen. Aus diesem Grunde fehlen auch vollständige Angaben über das Verhältnis der Fraktionen zueinander und zum Zellkern. Die umfangreichste Aussage in dieser Richtung machten Stedman und Stedman [28]. Diese Autoren geben für Leberzellkerne an: 27–30% Nukleinsäure, 17–26% Histon-sulfat und ca. 30% Nuchthiston (Chromosomin). Die Nukleinsäure wurde jedoch über den P-Gehalt des Gesamtkernes berechnet, über das Bindungsverhältnis des Histons mit Schwefelsäure ist nichts bekannt und das Nuchthiston ist nur durch Differenzrechnung bestimmt worden.

Es ist das Ziel dieser Arbeit gewesen, eine vollständige elektrophoretisch-analytische und chemisch-präparative Auftrennung der Kernproteide zu erreichen, die quantitative Zusammensetzung des Kernes aus diesen Fraktionen zu bestimmen und nach Möglichkeit diese chemischen Fraktionen mit den bekannten histologischen Strukturen in Beziehung zu setzen.

### Ausgangsmaterial und Methoden

Die Zellkerne wurden aus frisch entnommenen Schweinenieren dargestellt. Der Transport des Gewebes, das Entbluten mit 10%iger Zuckerlösung sowie die übrigen Arbeitsgänge der Kerndarstellung erfolgten unter Kühlung mit einer Kältemischung. Die Kerndarstellung wurde nach der Methode von Lang und Siebert [16] vorgenommen.

Um den Rohrzucker von der Kerndarstellung her sowie letzte Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Kerne zweimal mit 0,14 M NaCl (ca. 3% des Gewebegewichtes) gewaschen. Die stets durchgeführte mikroskopische Kontrolle der Reinheit erfolgte durch Lufttrocknung eines Ausstriches und Anfärbung mit Eosin-Methylenblau nach May-Grünwald. Für die Untersuchungen wurde nur Kernmaterial verwandt, das frei von Verunreinigungen war und ausschließlich intakte Kerne mit deutlich erkennbaren Nukleoli darstellte. Die Kerne wurden nicht getrocknet und nicht von den Lipoiden befreit. Die für die quantitativen Untersuchungen erforderlichen größeren Mengen mußten über Nacht im Eisschrank gelagert werden, die dadurch bedingten Veränderungen wurden durch sofort weiterverarbeitete Parallelen erfaßt und bei den speziellen Einzeluntersuchungen berücksichtigt.

Die elektrophoretischen Untersuchungen wurden mit dem Mikroelektrophoresegerät nach Antweiler [2] durchgeführt, die Dialyse erfolgte in Spezialgefäßen, in denen sie nach ca. 60 Minuten beendet war, wodurch Proteinveränderungen und -verluste, wie sie Ahlström [1] und Frick [10] beobachteten, vermieden wurden. Die Messung von Wanderungsgeschwindigkeiten war mit dem Gerät nicht ohne weiteres möglich, da es weder mit einem Thermostaten noch mit einer geeigneten Kühlvorrichtung ausgerüstet ist.

Die Extraktion der Protein- und Nukleinsäurefraktionen erfolgte in einem Glashomogenisator vom Typ Potter-Elvehjem, in dem die Ausgangssubstanz mit dem jeweiligen Lösungsmittel innig durchmischt wurde. Zur vollständigen Extraktion waren oft 10–15 Einzalextraktionen erforderlich. Die Abtrennung der Lösung von der suspendierten Substanz erfolgte durch Zentrifugation bei 3600 U/min und Abheben des Überstandes mit Mikropipetten.

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde die Proteinlösung in zehn Röhrchen mit 0,1 N HCl (bzw. NaOH) versetzt, und zwar derart, daß jedes Röhrchen sich vom vorhergehenden um 0,03 cm<sup>3</sup> HCl (NaOH) unterschied und das säurereichste (alkalereichste) die maximale Flockung bereits überschritten hatte. Die Gläser wurden dann gut durchgeschüttelt und die pH-Werte mit der Glaselektrode (bzw. Chinhydronelektrode) bestimmt. Nach Zentrifugation über 10 Minuten bei 3600 U/min wurde die Vollständigkeit der Fällung beurteilt.

Der Stickstoff wurde nach der Methode von Kjeldahl mit der Mikroapparatur von Parnas und Wagner vorgenommen, der Phosphor nach der Methode von Lohmann und Jendrassik [17], das Eisen nach der Methode von Borei [3] und der Zucker nach der Methode von Schoorl-Luff [25] bestimmt.

## Chemische und elektrophoretische Untersuchung der Zellkerne

### 1. Allgemeine Kernuntersuchungen

Um einen Überblick über die zu erwartenden Fraktionen sowie die relative Lage ihrer Gradienten zueinander im Diagramm zu bekommen,

wurde mit einer elektrophoretischen Gesamtuntersuchung aller löslichen Kernproteide begonnen. In Vorversuchen wurde gefunden, daß die geeignetsten elektrophoretischen Bedingungen in einem Borat-NaOH-Puffer vom pH 11,3 bei einer Ionenstärke entsprechend einer 0,075 m Konzentration, einer Spannung von 70 Volt und einer Stromstärke von 2,1 mA vorliegen. Der Stickstoffgehalt des Pufferextraktes lag bei 78–85% des Gesamt-N der Kerne, der Phosphorgehalt war nahe 100% des Gesamt-P. Diese Versuchsbedingungen erwiesen sich für fast alle Fraktionen — auch

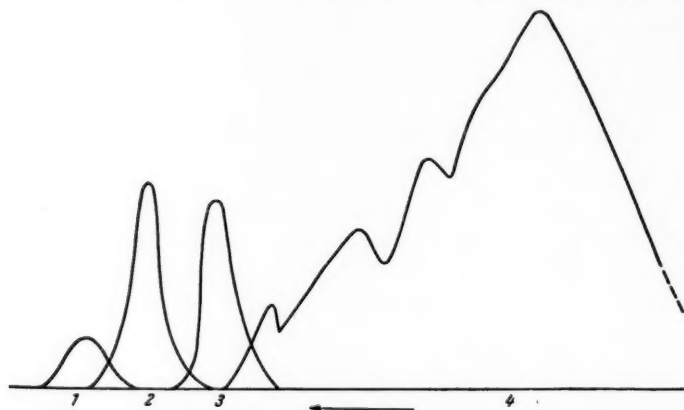


Abb. 1. Kernextrakt mit Borat-NaOH-Puffer pH 11,3 0,075 m, 80 Minuten dialysiert gegen Puffer 0,150 m, Wanderungszeit 20 Minuten, Temperatur 16,1° C, Spannung 70 Volt, Stromstärke 2,1 mA, 1305 Gamma N und 238 Gamma P im Kubikzentimeter.

bei der Einzeluntersuchung — geeignet und erlauben, die Gradienten durch direkten Vergleich der Diagramme zu identifizieren. In Abb. 1 ist ein Elektropherogramm einer Gesamtuntersuchung der löslichen Kernproteide

Tabelle 1.

Frischgewicht in mg	Trockengewicht		N in %	P in %	N:P
	in mg	in % Fr.-Gew.			
520	98	18,8	5,90	0,91	6,50
5380	575	10,7	5,35	0,83	6,40
1105	156	14,2	5,70	0,85	6,70
565	112	19,8	5,58	0,92	6,00
Mittelwert		15,9	5,63	0,89	6,32

wiedergegeben. Der Gradient Nr. 4 konnte auf Grund seiner Lage als das am stärksten basische Protein — und damit als Histon — angesehen werden. Aus diesem Grunde wurden auch die vier hinteren Gipfel des Diagramms als ein Gradient angesprochen, denn seit den Untersuchungen von Sted-

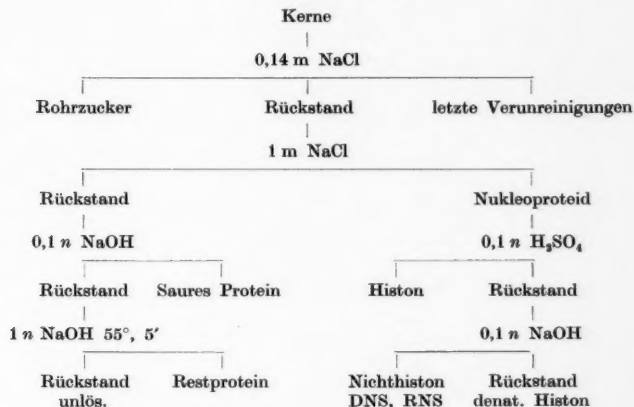
man und Stedman wird das Histon als aus mehreren Unterfraktionen bestehend angesehen. Die Schwierigkeiten bei der interferometrischen Messung dieser Fraktion sowie das Bild des betreffenden Abschnittes des Meßkanals machten wahrscheinlich, daß das Protein sich nahe der Koagulation befindet.

Die allgemeine chemische Untersuchung des Kernmaterials erstreckte sich auf die Bestimmung des Trockengewichtes, des Stickstoff- und Phosphorgehaltes sowie des N : P-Verhältnisses. Siehe Tab. 1.

Die chemische Auftrennung der Kernproteide wurde durch fraktionierte Extraktion und Fällung zu erreichen versucht. Unter vorwiegender Verwendung der bei den Untersuchungen der Einzelfractionen gebräuchlich gewordenen Verfahren konnte ein Trennungsgang zusammengestellt werden, der hier als Trennungsgang I bezeichnet wird.

Die Fraktionierung gelang auf diesem Wege jedoch nur teilweise, so daß später ein neuer Trennungsgang (II) entwickelt werden mußte (siehe Schema S. 272).

### Trennungsgang I



## 2. Das Nukleoprotein im herkömmlichen Sinne

Nach der Methode von Mirsky und Pollister wurde die Fraktion mit 1 m NaCl aus dem Kernmaterial herausgelöst und durch Verdünnen der Lösung auf eine Salzkonzentration von 0,14 m wieder ausgefällt. Die Fällung wurde abzentrifugiert und zur Reinigung noch zweimal wieder aufgelöst und ausgefällt. Wurde die Substanz nicht sofort weiterverarbeitet, so wurde sie im Hochvakuum bei 1 mm Hg über Silicagel oder Schwefelsäure getrocknet. Zur Charakterisierung der Fraktion wurde der N- und P-Gehalt der Trockensubstanz bestimmt:

12,8—13,0% N    2,28—2,34% P    N : P = 5,6

Die elektrophoretische Untersuchung ließ deutlich drei Hauptgradienten erkennen, von denen der dritte unverkennbar das Histon war. Siehe Abb. 2.



Die quantitative Bestimmung des Nukleoproteidanteiles vom Gesamtkern wurde zunächst gravimetrisch durchgeführt. Die feuchten Kerne wurden gut durchmischt, in einem Anteil das Trockengewicht bestimmt und der Rest zur Nukleoproteidgewinnung verwandt. Da das Trockengewicht

Tab. 2. Nukleoproteidgehalt der Zellkerne.

Bestimmungsweg	Gesamtkerngewicht in mg	Nukleoproteidgehalt	
		in mg	in %
gravimetrisch	661	435	66,0
	1267	816	64,5
	667	435	65,3
	832	550	66,2
	485	327	67,5
über N- und P-Gehalt	566	371	65,5
	420	267	63,6
	486	335	69,0
	332	282	65,4

des Nukleoproteids durch unvollkommene Ausfällung vermindert ist, wurde es nicht auf die in Trockenkerne umgerechnete Ausgangsmenge an feuchten Kernen bezogen, sondern auf den Mittelwert von diesem Wert und der Summe der Trockengewichte aller Kernfraktionen.

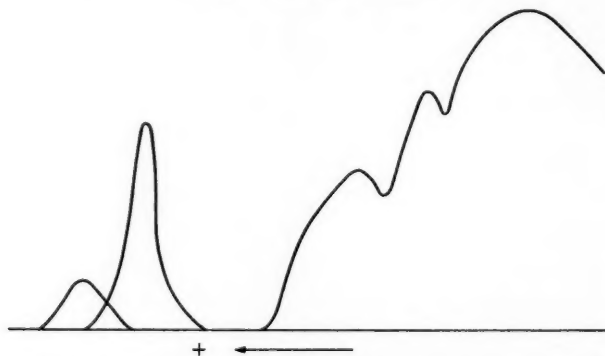


Abb. 2. Nukleoproteid aus 1 m NaCl in Borat-NaOH-Puffer pH 11,3 0,075 m, 80 Minuten dialysiert gegen Puffer 0,150 m, Wanderungszeit 20 Minuten, Temperatur 16° C, Spannung 75 Volt, Stromstärke 1,9 mA.

Außerdem wurde der prozentuale Anteil des Nukleoproteids am Gesamtkerngewicht auch über die N- und P-Werte berechnet. Die Zellkerne wurden im Homogenisator mit 1 m NaCl behandelt und in aliquoten Teilen des Homogenates die N- und P-Gehalte bestimmt. Der Hauptteil des Homogenates wurde zur Nukleoproteidextraktion verwandt. Die gesammelten Extrakte wurden gut durchmischt und auch in ihnen die N- und P-Gehalte bestimmt. Bei der Umrechnung der Analysenwerte in Milligramm Nukleo-

proteid wurde der P-Gehalt gleich 9,89% der Nukleinsäure genommen, der der Nukleinsäure zugehörige Stickstoff (16,77%) vom Gesamt-N abgezogen und der verbleibende N mit 17% des Proteins gleichgesetzt<sup>2</sup>. Siehe Tab. 2.

Eine quantitative Auswertung der elektrophoretischen Untersuchungen war nicht möglich gewesen, da das Histon sich nahe der Koagulation befand und seinen Brechungsindex geändert hatte.

### 3. Das Histon

Auf Grund des basischen Charakters des Proteins kann es durch Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure und Ausfällung mit Alkohol gewonnen werden. Die Verwendung von Säure als Lösungsmittel für ein Protein ist natürlich kein ideales Vorgehen, ferner muß befürchtet werden, daß eine teilweise Abspaltung von P aus der DNS erfolgt. Die Untersuchungen von Butler und Davidson [5] zeigten jedoch, daß bei Gewinnung des Histons durch Aussalzen mit Ammonsulfat und anschließender Dialyse das Histon in größerem Umfange als bei dem ersteren Verfahren verändert wird. Die Hälfte des Proteins war stets unlöslich geworden und der lösliche Teil hatte ein noch geringeres Molekulargewicht. Es wurde daher auch hier das Histon durch Extraktion mit 0,1 n Schwefelsäure — und zwar des bereits isolierten Nukleoproteids — dargestellt. Es erwies sich als außerordentlich empfindlich und denaturierte schnell, so daß die Flüssigkeit während der Extraktion und Fällung immer kurz vor dem Einfrieren gehalten werden mußte. Diese hohe Empfindlichkeit ist nicht gut mit dem bisher immer angenommenen niederen Molekulargewicht zu vereinen. Nach einer der letzten physikalischen Untersuchung (Steiner [30]) ist dem Protein auch ein Molgewicht von 5.800.000 zuzusprechen. Sollte sich dieser Befund bestätigen, so wäre das Hauptargument dafür, daß das Histon eine untergeordnete Rolle in Zellkern und Chromosomen spielt, hinfällig und die Verlagerung des Schwerpunktes auf das Nihthiston (Stedman und Stedman) verfrüht.

Der isoelektrische Punkt wurde bei Messungen mit der Glaselektrode bei pH 8,6 gefunden. Das Histonsulfat hatte einen N-Gehalt von 13,9%. Zur Bestimmung des Reinproteingehaltes wurde die Brechung einer 1%igen Lösung mit dem Interferometer bestimmt; unter Benutzung des üblichen Brechungsindex ergab sich für die Histonsulfatlösung ein Proteingehalt von 77% und daraus ein korrigierter N-Gehalt des Histons von 18,2%.

Die elektrophoretische Untersuchung erforderte eine kathodische Wanderung, da hierbei trotz großen Ladungsgefälles eine zu alkalische Reaktion vermieden wird. Am günstigsten erwies sich ein Zitrat-HCl-Puffer pH 1,4 bei 0,17 m Konzentration, Dialyse gegen 0,34 m Puffer über 80 Minuten, eine Spannung von 65–70 Volt und 1,9 mA. Das Diagramm ließ zunächst — genau wie bei der Wanderung im Borat-NaOH-Puffer — deutlich vier Fraktionen erkennen und die Angaben von Stedman und Stedman [28]

<sup>2</sup> Ein N-Gehalt von 17% erschien als ein geeigneter Mittelwert zwischen dem hohen N-Gehalt des Histons und dem eines normalen Proteins.

bezüglich der Unterfraktionen schienen sich zu bestätigen. Eine eingehende Untersuchung zeigte jedoch, daß bei Durchführung aller Arbeitsgänge bei tiefstmöglicher Temperatur das Histon einheitlich über die Trennstrecke wandert und somit die Unterfraktionen als Spaltprodukte anzusehen sind (siehe Abb. 3 und 4). In diesem Zusammenhange sei auch erwähnt, daß die

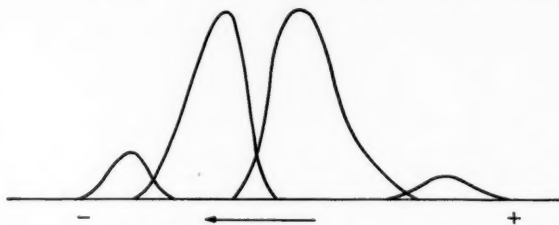


Abb. 3. Histon in Zitrat-HCl-Puffer pH 1,4 0,17 m, 80 Minuten dialysiert gegen Puffer 0,34 m, Wanderungszeit 13,5 Minuten, Temperatur 17,3° C, Spannung 65–70 Volt, Stromstärke 1,9 mA.

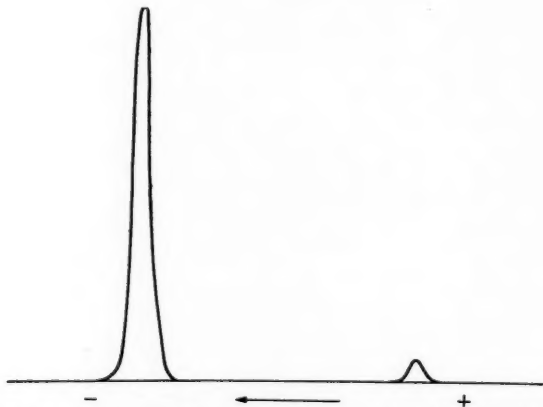


Abb. 4. Histon in Zitrat-HCl-Puffer pH 1,4 0,17 m, 80 Minuten dialysiert gegen Puffer 0,34 m, Wanderungszeit 15 Minuten, Temperatur 6,0° C, Spannung 60 Volt, Stromstärke 3,2 mA.

von Stedman und Stedman angegebenen unterschiedlichen Gehalte der Unterfraktionen an Arginin-N weitgehend mit denen der ersten Spaltprodukte des Histons — den sogenannten Histozeptonen — übereinstimmen.

Bei der quantitativen Bestimmung des Histons wurde nicht wie bei Stedman und Stedman die Menge des ausgefällten Histonsulfats, sondern der Gewichtsverlust des getrockneten Nukleoproteids nach Extraktion mit 0,1 n Schwefelsäure bestimmt. Dadurch wurde der Fehler der unvollkommenen Ausfällung (Histonextrakte sind stets außerordentlich schwach konzentriert) sowie die Umrechnung von Histonsulfat in Histon vermieden. Nach den gemachten Erfahrungen war jedoch damit zu rech-

nen, daß nur ein Teil des Histons herausgelöst wurde. Da sich inzwischen gezeigt hatte, daß der verbleibende Nukleinsäure-Nichthiston-Komplex

Tab. 3. Gehalt des Nukleoproteids an extrahierbarem und nicht extrahierbarem Histon.

Nukleoprotein in mg	Extrahierbares Histon in mg	Nicht extra- hierbares Histon in mg	Gesamthiston in mg	Histon in % N-Pr.
435	130	98	228	52,3
800	178	220	398	49,8
420	116	96	212	50,4
350	107	73	180	51,6
500	153	113	266	53,1

sehr viel stabiler als das Histon und gut in 0,1 n NaOH löslich ist, wurde der nach der Extraktion mit verdünnter Schwefelsäure und mit NaOH verbleibende unlösliche Rückstand als denaturiertes Histon (und nicht als ungelöstes Nichthiston) angesehen und in Ergänzung des löslichen Histons bestimmt. Die Untersuchungen innerhalb des Trennungsganges II bewiesen später die Richtigkeit eines derartigen Vorgehens.

#### 4. Der Nichthiston-Nukleinsäure-Komplex

Das Diagramm der elektrophoretischen Untersuchung ist in Abb. 5 wiedergegeben. Der Gradient Nr. 1 hatte eine Gesamtbrechung von 0,8 $\lambda$ , der Gradient Nr. 2 eine solche von 5,48 $\lambda$ . Der über die N- und P-Analysen bekannte Nukleinsäure- und Proteingehalt der elektrophoretisch untersuchten Lösung wurde in  $\lambda$  Gesamtbrechung umgerechnet<sup>3</sup> und erlaubte so festzustellen, daß Gradient Nr. 1 durch die Nukleinsäure und Gradient Nr. 2 durch das Protein bedingt wird.

Die quantitative Auswertung einer Reihe von Diagrammen ließ im Vergleich mit den Ergebnissen über die N- und P-Analysen eine Divergenz erkennen, die nur durch eine weitere P-haltige Fraktion zu erklären war

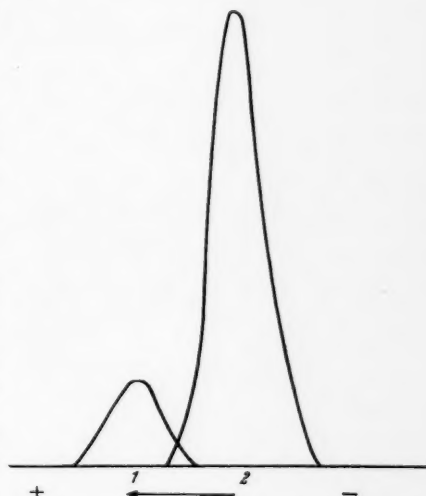


Abb. 5. Nukleinsäure-Nichthiston in Borat-NaOH-Puffer pH 11,5 0,075 m, 80 Minuten dialysiert gegen Puffer 0,150 m, Wanderungszeit 7 Minuten. Temperatur 10° C, Spannung 75 V, Stromstärke 2,1 mA.

<sup>3</sup> Der Brechungsindex der Nukleinsäure wurde an einer nach der Methode von Hammarsten [13] dargestellten und nach der Methode von Sevag [24] gereinigten Nukleinsäure bestimmt.

(vgl. Tab. 4). Eingehende elektrophoretische Untersuchungen in dieser Richtung führten schließlich bei längerer Wanderungszeit und stärkerem elektrischem Felde zur Auffindung dieser Fraktion (s. Abb. 6). Vom Proteingradienten

Tab. 4. Anteil von Nukleinsäure und Nüthiston am Nukleinsäure-Nüthiston-Komplex.

Bestimmungsweg	Komplex		Nukleinsäure		Nüthiston	
	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
elektrophoretisch		100		35,6		64,4
		100		35,0		65,0
		100		35,3		64,7
		100		32,3		67,7
		100		38,1		61,9
N- und P-Analysen	207		99	48,0	108	52,0
	300		119	39,8	181	60,2
	170		76	44,9	94	55,1
	208		96	46,1	112	53,9
	245		104	42,5	141	57,5

ten trennte sich eine zusätzliche kleine Fraktion (die dritte) ab, die nach der Ablösung eine erheblich größere Wanderungsgeschwindigkeit als das Protein zeigte. Wird der neue Gradient als Protein ausgewertet, so ergibt sich

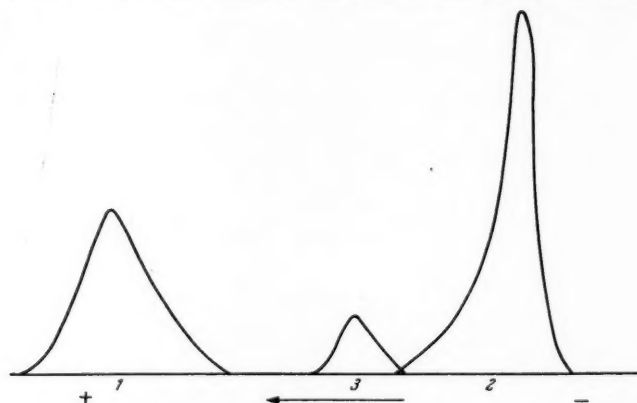


Abb. 6. Nukleinsäure-Nüthiston in Borat-NaOH-Puffer pH 11,3 0,075 m, 80 Minuten dialysiert gegen Puffer 0,150 m, Wanderungszeit 12 Minuten, Temperatur 16° C, Spannung 80 Volt, Stromstärke 2,6 mA.

ein Betrag von nur wenigen Prozenten der Hauptfraktion. Da der neue Gradient ferner durch eine Substanz bedingt sein muß, die den differierenden P enthält, wurde angenommen, daß es sich um eine prosthetische Gruppe handelt. Nach Überprüfung der drei Möglichkeiten Phosphorsäure, Nukleinsäure und Lipoid bezüglich P-Gehalt und Brechungsindex ergab sich, daß nur bei Annahme einer Nukleinsäure eine zahlenmäßige Über-

einstimmung mit den Werten über die N- und P-Analysen zu erreichen ist. Siehe Tab. 5. Der später gelungene Nachweis der RNS in diesem Komplex bestätigte diese zunächst rein rechnerische Deutung.

Tab. 5. Anteil von DNS, Nighthiston und angenommener RNS am Nukleinsäure-Nighthiston-Komplex (Berechnung nach Diagrammen).

Komplex in %	DNS in %	RNS in %	Nighthiston in %
100	34,2	11,8	54,0
100	36,3	14,2	49,5
100	38,0	12,6	49,4
100	41,0	7,8	51,2

Bei allen Versuchen innerhalb dieses Trennungsganges, den Komplex chemisch in seine Komponenten aufzuspalten, wurde stets ein Protein erhalten, das in keinem der bekannten Medien löslich war. Auch die Nukleinsäuren konnten nicht getrennt werden.

### 5. Das Saure Protein

Diese Fraktion wurde mit 0,1 *n* NaOH herausgelöst, durch Ansäuern auf einen pH von ca. 5,3–5,8 ausgefällt und durch zweimaliges Umfällen gereinigt. Der isoelektrische Punkt wurde bei einem pH von 4,6–4,7 gefunden. Die getrocknete Fraktion hatte einen N-Gehalt von 11% und einen P-Gehalt von 1,3%. Der Proteingehalt wurde über die Biuretreaktion nach der Methode von Weichselbaum bestimmt. Dieser Wert ergab zusammen mit dem in Phosphorsäure umgerechneten P-Gehalt (s. Abschn. Elektrophorese) 91,6% der Einwaage. Die fehlenden 8,4% wurden als Restfeuchtigkeit angesehen und die N- und P-Werte auf das so korrigierte Trockengewicht umgerechnet. Es ergab sich: 12,0% N, 1,35% P sowie ein N : P = 8,9.

Das Diagramm der elektrophoretischen Untersuchung zeigte zunächst einen einheitlichen Gradienten, bei schärferer Elektrophorese (80 Volt, 2,6 mA, 15 Min.) erfolgte jedoch auch hier die Ablösung eines — allerdings sehr kleinen — Gradienten. Seine Auswertung über Gesamtbrechung und Brechungsindex von Protein, Phosphorsäure, Nukleinsäure und Lipoid ließ vermuten, daß es sich bei der Gesamtfraktion um ein Phosphorprotein handelt. Durch spektralphotometrische Messung stark verdünnter Lösungen der Fraktion konnte ferner gezeigt werden, daß die Absorption im UV kein Maximum bei 2600 Å besitzt und somit Nukleinsäure als prosthetische Gruppe nicht in Frage kommt. Der hohe P-Gehalt des Sauren Proteins macht aber den P-Gehalt der Vorfraction erforderlich, während die geringe Gesamtbrechung ein Lipoid unwahrscheinlich macht<sup>4</sup>. Auch die sonstigen Eigenschaften, wie Löslichkeitsverhalten, Stabilität, IEP, leichte Abspaltbarkeit des P durch 1%ige NaOH sprechen für ein Phosphoprotein.

Der prozentuale Anteil des Sauren Proteins am Gesamtkerngewicht wurde wieder gravimetrisch und über die N- und P-Werte bestimmt.

Tab. 6. Anteil des Sauren Proteins am Gesamtkerngewicht.

Bestimmungsweg	Gesamtkerngewicht in mg	Saures Protein	
		in mg	in % Ges.-Gew.
gravimetrisch	796	369	29,0
	672	163	23,2
	464	118	25,8
	572	157	27,4
N- und P-Analyse	566	149	26,3
	420	121	28,8
	486	135	27,8
	332	129	29,8

### 6. Das Restprotein

Das Restprotein ergibt sich, nachdem alle anderen Fraktionen des Zellkernes entfernt worden sind als unlöslicher Rückstand. In getrocknetem Zustand besitzt es eine grauweiße Farbe und stellt eine aus lamellenartig

Tab. 7. N- und P-Gehalt des Restproteins.

Restprotein in mg	N		P	
	in mg	in %	in mg	in %
60,0	5,0	8,3	0,06	0,1
16,6	1,3	7,8		
10,3	0,8	8,4		
15,2			0,06	0,37
12,0			0,01	0,07

dünnen Schichten zusammengepackte Substanz großer Festigkeit und hoher Elastizität dar (wodurch es u. a. schwierig ist, homogene Analysenproben zu erhalten). Über den N- und P-Gehalt informiert die Tab. 7.

Die Phosphoranalysen erfuhren starke Störungen durch gelblichweiße Ausfällungen, die beim Neutralisieren in der Veraschungslösung auftraten. Die Ausfällungen ergaben, nach Auflösung in HCl, mit Rhodanid die Eisenreaktion. Versuche, das Eisen vor der Veraschung mit Säuren herauszulösen, schlugen fehl, so daß angenommen wurde, daß es nicht in ionisierter Form, sondern fest an das Protein gebunden vorliegt. Die Bestimmung des Eisengehaltes zeigte variable Werte zwischen 1,2 und 3,7% des Restproteins.

Ausgehend von dem Gedanken, daß der Kernmembran — sofern sie als selbständige chemische Fraktion vorhanden ist und bei der Fraktionierung erfaßt wird — nur die im Umfange kleinste Fraktion zugeordnet werden kann, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß das Restprotein das Material der Kernmembran sei. Der geringe P-Gehalt stimmte mit

<sup>4</sup> Es ließ sich zwar mit heißem Alkohol eine im UV-Licht fluoreszierende Lösung erhalten, wurde diese jedoch zur Trockne eingedampft, so konnte aus dem Rückstand kein chloroformlöslicher Phosphor gewonnen werden, der für ein Lipoid gesprochen hätte.



dieser Überlegung überein, da nach den allgemeinen Anschauungen die natürlichen semipermeablen Membranen phosphatidhaltig sind. Es wurde daher versucht, die Lösung der Fraktion durch Spaltung des hypothetischen Lipoproteids zu erreichen. In Annäherung an eine übliche Methode zur Aufhebung von Lipoproteinbindungen (Erhitzen auf 55 Grad bei pH 3,0 oder 12,0) wurde die Fraktion mit Alkalien in der Wärme behandelt. Es erwies sich als am günstigsten, mit 1 *n* NaOH bei 55 Grad über 5 Minuten zu arbeiten. Wenn die getrocknete Substanz gelöst werden sollte, war es zweckmäßig, mit Wasser und anschließend mit 0,1 *n* NaOH vorzuquellen. Hierdurch wurde vermieden, daß einzelne kleine Partikel von gequollenem Protein eingeschlossen werden und so nicht mit dem Lösungsmittel in Berührung kommen. Es konnten so 94–98% des Restproteins gelöst und durch Ansäuern mit 2 *n* HCl gewonnen werden. Der verbleibende unlösliche Rückstand (ca. 0,1–0,7% der Kerne) ist von schmutziggrauer bis schwarzer Farbe, er besitzt keine meßbaren Beträge an N und P. Beim Abzentrifugieren des gefällten Proteins trat häufig eine Aufspaltung in ein Sediment (ca. 64%) und einen an der Oberfläche schwimmenden Teil (ca. 36%) ein.

Die so gewonnene Fraktion war nun auch in 0,1 *n* NaOH löslich und konnte daher unter den üblichen Bedingungen elektrophoretisch untersucht werden. Das Diagramm zeigte vor dem eigentlichen Gradienten einen kleinen Vorgradienten, der in der üblichen Weise (s. S. 269) zu deuten gesucht wurde. Zusammen mit den bei der Auflösung des Proteids gemachten Beobachtungen und Betrachtungen wurde die Vorfraktion als ein Phosphatid angesehen, obgleich ein endgültiger Beweis nicht erbracht werden konnte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über den prozentualen Anteil des Restproteins am Gesamtkern sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 8. Anteil des Restproteins am Gesamtkerngewicht.

Bestimmungsweg	Gesamtkern- gew. in mg	Restprotein	
		in mg	in %
gravimetrisch	796	100	8,0
	672	77	11,0
	464	32	7,0
N- und P-Analyse	566	46,2	8,1
	420	31,2	7,4
	486	15,7	3,2
	332	21,6	5,0

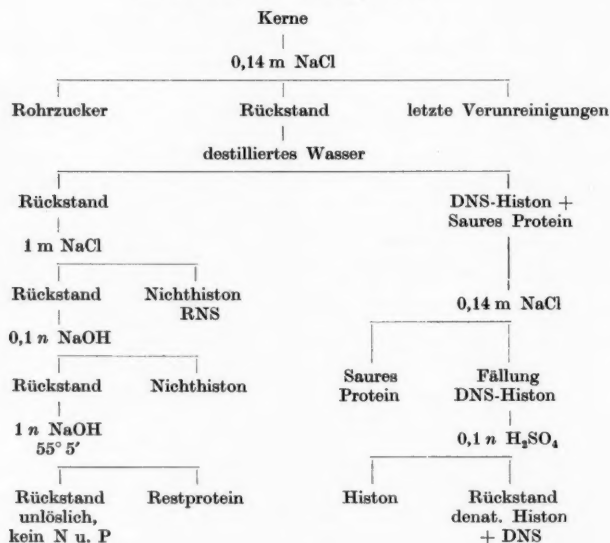
*Zusammenfassung der Ergebnisse des Trennungsganges I über die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen am Gesamtkern.*

Nukleoprotein . . . . .	65,9%
Histon . . . . .	33,7%
DNS . . . . .	12,9%
RNS . . . . .	3,8%
Nichthiston . . . . .	16,5%
Saures Protein . . . . .	27,2%
Restprotein . . . . .	7,1%

## Trennungsgang II

Da die Abtrennung des Nichthistons von dem DNS-Histon und der wahrscheinlich gewordenen RNS im Gang I nicht gelungen war, mußte dieser zweite Trennungsgang entwickelt werden. Die im Gang I erworbenen Kenntnisse über die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen am Gesamtkern erleichterten die Suche sehr und es wurde gefunden, daß bei Extraktion mit destilliertem Wasser das DNS-Histon zusammen mit dem Sauren Protein entfernt wird, das Nichthiston und die RNS jedoch diesmal zurückbleiben. Diese beiden letzten Fraktionen konnten anschließend mit 1 m NaCl gelöst werden. Gaydusek [11] hatte bereits destilliertes Wasser zur Gewinnung des „Nukleoproteids“ benutzt, ohne jedoch besondere Vorteile bei diesem Verfahren zu finden. Bei seinen elektrophoretischen Untersuchungen bekam er zwar andere Ergebnisse als bei dem Nukleoprotein aus 1 m NaCl, doch deutete er dies durch ein verändertes physiko-chemisches Verhalten bedingt und hielt beide Substanzen für identisch. In Wahrheit ist jedoch das „Nukleoprotein“ aus 1 m NaCl ein aus DNS-Histon und RNS-Nichthiston zusammengesetztes Nukleoprotein.

## Schema des Ganges II



## DNS-Histon-Komplex

Die vollständige Extraktion des Komplexes mit destilliertem Wasser erforderte auf Grund des geringen Lösungsvermögens eine sehr große Flüssigkeitsmenge, die Ausfällung erfolgte jedoch nach Einstellen der Lösung auf eine NaCl-Konzentration von 0,14 m ohne Mühe.

Die elektrophoretische Untersuchung bereitete einige Schwierigkeiten, da schon geringste Salzkonzentrationen zur Ausfällung führten. Es gelang jedoch bei Verwendung eines Borat-NaOH-Puffers vom pH 11,5 und einer Konzentration von 0,019 m zu arbeiten. Das Diagramm zeigte zwei Gradienten, von denen der zweite wegen seiner Lage am Ende der Trennstrecke und seiner typischen stumpfen Kegelform als Histon angesehen werden konnte. Der erste Gradient entsprach in seiner Lage der DNS, die auch durch die Feulgenreaktion nachgewiesen werden konnte.

Der isoelektrische Punkt wurde bei pH 4,57 gefunden, die N- und P-Analysen ergaben bei üblicher Auswertung einen N-Gehalt von 17,8% und einen P-Gehalt von 3,0%, N : P-Verhältnis 5,77.

Die quantitative Bestimmung des Komplexes in bezug auf die Gesamtkerne erfolgte (mit einer Ausnahme) über die N- und P-Werte. Siehe Tab. 12.

Tab. 12. Anteil des Histons und der DNS am DNPr. sowie Anteil des DNPr. am Gesamtkern.

Gesamtkerne in mg	DNS in mg	Histon in mg	DNPr. in mg	DNPr. in %
851	104	304	408	48,0
705	71	248	319	45,3
825	99	281	380	46,0
gravimetrisch				
377			198	52,6

#### Ribonukleinsäure-Nichthiston-Komplex

Die Extraktion erfolgte mit 1 m NaCl, die Fällung durch Verdünnen der Lösung auf 0,14 molar an NaCl. Anfangs traten dadurch Unklarheiten auf, daß das Proteid nach Lagerung der Kerne im Eisschrank bereits in Nukleinsäure und Protein gespalten vorlag. In diesem Falle wird nämlich neben dem noch ungespaltenen Proteid auch die abgespaltene Nukleinsäure in 1 m NaCl gelöst, die dann nach Fällung bei 0,14 m NaCl in Lösung bleibt. Die abgespaltene Proteinkomponente kann dann anschließend mit 0,05 n NaOH aus dem Kernmaterial gelöst werden.

Es gelang so also erstmalig, das Nichthiston in löslicher Form zu gewinnen. Das Saure Protein stört bei diesen Arbeitsgängen nicht, da es bereits mit dem DNS-Histon entfernt worden war. Wurden die Kerne sofort nach ihrer Darstellung aufgearbeitet, so ließ sich das gesamte RNS-Proteid ungespalten mit 1 m NaCl extrahieren.

Die RNS konnte nach der Methode von Euler und Hahn [12] — bei der eventuell vorhandene DNS nicht störend wirkt — nachgewiesen werden.

Das Diagramm der elektrophoretischen Untersuchung ist demjenigen des Nichthiston-Nukleinsäure-Komplexes vom Trennungsgang I unverkennbar ähnlich, nur daß der Gradient der DNS fast verschwunden ist. Es konnte leider nicht geklärt werden, ob es sich bei der geringen DNS-Menge um eine Verunreinigung handelt oder nicht.

Der isoelektrische Punkt des Nukleoproteids wurde bei pH 4,3–4,5 gefunden, der des Nihthistons bei 5,7–5,8.

Die N- und P-Analysen ergaben 16,2% N, 2,16% P und ein N : P-Verhältnis von 7,5.

Tab. 13. Anteil des Nihthistons und der RNS am RNPr. sowie Anteil des RNPr. am Gesamtkern.

Gesamtkern in mg	RNS in mg	Nihthiston in mg	RNPr. in mg	RNPr. in %
851	34	146	180	21,2
705	33	141	174	24,7
825	37	146	183	22,2
gravimetrisch				
377			96	25,5

Der Anteil des Nihthistons und der RNS am Nukleoprotein sowie der Anteil des Nukleoproteids am Gesamtkern wurde (mit einer Ausnahme) über die N- und P-Werte bestimmt.

#### Das Saure Protein

Das Saure Protein wird bei diesem Trennungsgang — wie schon erwähnt — mit dem DNS-Histon zusammen mit destilliertem Wasser extrahiert. Nach Fällung des Desoxyribonukleoproteids bei 0,14 m NaCl bleibt es in Lösung und kann anschließend durch Ansäuern ausgefällt werden. Da die Fraktion normalerweise in destilliertem Wasser nicht löslich ist, muß angenommen werden, daß zwischen dem Nukleoprotein und dem Sauren Protein eine Bindung vorliegt, die beim Trennungsgang I durch die 1 m NaCl aufgehoben wird.

Die elektrophoretische Untersuchung und die Bestimmung des isoelektrischen Punktes brachten keine Abweichungen von den im ersten Trennungsgang gefundenen Ergebnissen. Auch der im getrocknetem Zustand vorhandene charakteristische Geruch und die gelbliche Färbung traten wieder auf.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung in bezug auf die Gesamtkerne sind in Tab. 14 wiedergegeben.

Tab. 14. Anteil des Sauren Proteins am Gesamtkern.

Gesamtkern in mg	Saures Protein in mg	Saures Protein in %
851	240	28,8
705	200	28,4
825	222	26,9
gravimetrisch		
377	74	19,6

Die quantitative Auswertung der Elektropherogramme von Lösungen, die neben Saurem Protein noch RNS, DNS und Nihthiston enthielten, wird

in Tab. 15 verglichen mit einer entsprechenden Zusammenstellung der Werte, die über die N- und P-Analysen erhalten wurden.

Tab. 15. *Prozentuale Anteile von Saurem Protein, DNS und RNPr. an der natürlichen Mischung im Kern.*

Bestimmungsart	Saures Protein in %	DNS in %	RNPr. in %
chemisch	45,0	15,8	39,2
	45,8	19,8	34,4
elektrophoretisch	41,6	20,8	37,5
	44,2	21,2	34,6

### Das Restprotein

Die Fraktion glich in Darstellung und Eigenschaften vollkommen der des ersten Trennungsganges. Nur der Anteil der Fraktion am Gesamtkern war etwas geringer und schwankte zwischen 1,7 und 3,6%.

Im folgenden sei eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Trennungsganges I und II über die prozentualen Anteile der einzelnen Fraktionen am Gesamtkern gegeben.

Trennungsgang	II	II	I
DNS-Nukleoprotein . . . . .		46,4%	
Histon . . . . .	34,9%		33,7%
DNS . . . . .	11,4%		12,9%
RNS-Nukleoprotein . . . . .		22,7%	
Nichthiston . . . . .	18,3%		16,5%
RNS . . . . .	4,4%		3,8%
Saures Protein . . . . .		28,0%	27,2%
Restprotein . . . . .		2,6%	7,1%
Summe . . . . .		99,7%	100,2%

### Histochemische Beurteilung der Zellkerne während der einzelnen Phasen der chemischen Trennungsgänge

In dem Bestreben, die Ergebnisse der chemischen Untersuchung der Kernproteide mit den histochemischen Ergebnissen vergleichen zu können, wurden die Zellkerne nach jeder einzelnen Extraktion beider chemischen Trennungsgänge mit der Eosin-Methylenblau-Lösung nach May-Grünwald angefärbt und mikroskopisch beurteilt. Es war erforderlich, mit relativ geringen Kernmengen gegenüber der Lösungsmittelmenge zu arbeiten, damit trotz kurzer Extraktionsdauer eine vollständige Herauslösung der Fraktionen erfolgt. Die mechanische Beanspruchung der Kerne wurde ferner durch sehr langsame und vorsichtige Bewegungen des Homogenisatorkolbens so gering wie möglich gehalten.

**Trennungsgang I:** Vor der Fraktionierung sind die Kerne kräftig blau gefärbt und lassen den tiefblauen Nukleolus deutlich erkennen.

Nach der Extraktion mit 1 *m* NaCl sind die Kerne rein rot gefärbt, der Nukleolus ist nicht mehr zu erkennen. Nach Entfernung des Sauren Proteins ist die rote Farbe verschwunden (auch isoliertes Saures Protein färbt sich mit dem Reagens rein rot). Die Kerne sind stark gequollen und bilden durchsichtige zarte Bläschen, in denen zahlreiche kleine bläuliche Partikel eingebettet sind und in ihrer Gesamtheit dem Kernbläschen einen schwachen bläulichen Schimmer verleihen. Diese Partikel liegen anscheinend im Innern der Bläschenwand und beulen deren Oberfläche aus, wodurch sie ein leicht warziges Aussehen erhält. Chemisch liegt zu diesem Zeitpunkt nur noch das Restprotein vor, das sich somit auch nach dem histochemischen Bilde als aus zwei Komponenten bestehend erweist.

**Trennungsgang II:** Die Extraktion mit destilliertem Wasser führt sofort zu dem Bild des Restproteins, d. h. den leicht bläulichen Kernbläschen des ersten Trennungsganges. Daneben treten — über das Präparat verteilt — viele kleine, tiefblau gefärbte Teilchen irregulärer Form auf. Ferner — allerdings ganz selten — große runde bis ovale Körper von glatter Oberfläche, die gleichfalls tiefblau gefärbt sind (entsprechend der Farbe der Nukleoli). In der Größe liegen diese runden Körper weit unter denen der Zellkerne, sie sind aber auch erheblich größer als die normalen unbehandelten Nukleoli. Die durch die Alkalien zu erwartende Quellung der Nukleoli konnte leider nicht abgeschätzt werden, so daß eine Gleichsetzung der gefundenen Körper mit Nukleoli Vermutung bleiben muß. Die vielen kleinen tiefblauen Teilchen dürften sehr wahrscheinlich als Trümmer der besagten Körper angesehen werden. Nach Extraktion mit 0,1 *n* NaOH (Entfernung von Nihthiston bzw. Nihthiston-RNS) liegen mikroskopisch nur noch die Kernbläschen vor.

### Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigten, daß entgegen manchem Erwarten die Proteinfraktionen — selbst das Histon — einheitlich sind, d. h. nicht aus Unterfraktionen bestehen. Ferner kann die — in der kürzlich erschienenen Arbeit von Mauritzen, Roy und Stedman [18] wiederaufgestellte — Behauptung, daß die im Kern vorliegende RNS-Menge so gering sei, daß sie als Verunreinigung bezeichnet werden muß, erneut widerlegt werden. Die hier gefundenen Werte für das DNS/RNS-Verhältnis von 29,5—58,6% sind zwar etwas hoch, aber doch vergleichbar mit denen von Thomson, Heagy und Davidson [31], die bei histochemischen Untersuchungen einzelner Zellen 12,5—33% des DNS-Gehaltes an RNS fanden. Die Werte für den DNS-Gehalt des Zellkernes stimmen recht gut mit denen von Caspersson überein, der über UV-Absorptionsmessungen 10—20% fand, im Durchschnitt jedoch nur Werte nahe 10%.

Der hier gefundene Weg der Trennung der beiden Nukleinsäuren in einem Stadium, da sie sich noch innerhalb ihrer natürlichen Proteidkomplexe befinden, könnte vielleicht für die zahlreichen Untersuchungen mit diesen wichtigen Kernbestandteilen methodische Verbesserungen bringen.

Für die quantitativen Ergebnisse der Proteinfraktionen sind leider fast

keine Vergleichsmöglichkeiten in der Literatur gegeben. Die vollständigste Angabe von Stedman und Stedman für den Nukleoproteidgehalt der Zellkerne (er ist nur ableitbar) mit 74,3% kommt den hier gefundenen Werten von 65,9–69,1% sehr nahe, wenn man bedenkt, daß von verschiedenem Untersuchungsmaterial keine übereinstimmenden Werte zu erwarten sind. Im allgemeinen lassen die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen erkennen, daß schon bei Verarbeitung von ca. 500–600 g Gewebe sich für die einzelnen Kernfraktionen erstaunlich konstante Werte ergeben, die natürlich im Hinblick auf die periodische Zu- und Abnahme der Proteine und Nukleinsäuren im Kernstoffwechsel als statistische zu betrachten sind. An Hand solcher quantitativen Ergebnisse von einem gesunden Gewebe müßte es in Zukunft möglich sein, Abweichungen von diesen relativen Verhältnissen mit pathologischen Vorgängen der Zellphysiologie in Zusammenhang zu bringen, ähnlich wie dies bei der elektrophoretischen Serumuntersuchung heute schon in großem Umfange geschieht. Es erscheint denkbar, daß für viele Fälle eine elektrophoretische Gesamtuntersuchung der Zellkerne in Art der Abb. 1 genügen würde.

In der — mir erst nach Beendigung dieser Untersuchungen im Frühjahr 1953 zur Einsicht gelangenden — Arbeit von Carver und Thomas [8] kommen die Autoren zu dem Schluß, daß das Saure Protein ein Lipoprotein sei, da sie bei einer Alkoholextraktion wägbare Substanzmengen (8–9%) herauslösen konnten. Die vorliegende Untersuchung konnte dieses Ergebnis nicht bestätigen. Abgesehen davon, daß mit 8–9% Lipoid der P-Gehalt der Fraktion nicht erklärt werden kann, führen die Untersucher als einzigen Beweis den Gewichtsverlust nach Behandlung mit heißem Alkohol an, in dem sich aber nicht nur Lipide lösen (z. B. auch Phosphorsäure). In den Angaben bezüglich des isoelektrischen Punktes (pH 4,6–4,8) liegt mit den hier gefundenen Werten volle Übereinstimmung vor.

Die von Kirkham und Thomas [15] gefundene „neue“ Proteinfraktion des Zellkernes ist zweifellos das Saure Protein, das bei pH 5,3 ausgefällt werden kann, dessen genauer IEP jedoch bei pH 4,6–4,8 liegt. Die quantitative Angabe von 26–27% des Gesamtkernes deckt sich gut mit den hier gefundenen Werten.

Die Frage, ob die Kernmembran nur eine Schicht verdichteten Kernsaftes oder eine definierte andere chemische Substanz ist, konnte zugunsten der letzteren Anschauung entschieden werden, sie macht innerhalb der chemischen Fraktionen das Restprotein aus.

### Zusammenfassung

1. Es wurden Zellkerne aus Nierengeweben nach der Methode von Lang und Siebert dargestellt.

2. Es erfolgte eine vollständige elektrophoretische und chemische Fraktionierung der Zellkernproteine und -nukleinsäuren, gefunden wurden: Histon, Nichthiston, Saures Protein, Restprotein, Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Ribonukleinsäure (RNS).



3. Die Proteinfractionen wurden charakterisiert durch ihren isoelektrischen Punkt, N%, P% und N:P-Verhältnis. Es wurde bewiesen, daß das Nüthiston den Charakter eines Ribonukleoproteids hat. Für das Saure Protein konnte der Charakter eines Phosphorproteids, für das Restprotein der Charakter eines Lipoproteids wahrscheinlich gemacht werden.

4. Die quantitative Zusammensetzung des Zellkernes aus diesen Fraktionen wurde gravimetrisch, über N- und P-Analysen und teilweise durch Auswertung elektrophoretischer Diagramme bestimmt.

5. Die Einheitlichkeit des Histons konnte durch Innehaltung besonders optimaler Versuchsbedingungen elektrophoretisch bewiesen werden.

6. Es wurde ein Weg zur Lösung des bisher unzugänglichen Restproteins gefunden.

7. Die Äquivalenz von Restprotein und Kernmembran wird wahrscheinlich gemacht.

#### Literatur

- [1] Ahlström, L., 1949: Ark. Kemi 24 A, H. 5, 31, 1—17, ref. in Ber. ges. Physiol. 137 B, 159.
- [2] Antweiler, H. J., 1949: Kolloid-Z. 115, 130.
- [3] Borei, H., 1945: Biochem. Z. 314, 359.  
— 1951: In K. Hinsberg und K. Lang, Medizinische Chemie. Urban & Schwarzenberg, München und Berlin, S. 24.
- [4] Brachet, J., 1950: Ann. New York Acad. Sci. 50, 861.  
— 1946: Un Symposie sur les protéines. Liège.
- [5] Butler, A. V., F. P. Davidson, and D. W. F. James, 1955: Biochem. J. 54/3, XXI.
- [6] Caspersson, T., 1956: Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8.
- [7] — 1950: New York, Norton & Co. Inc., S. 85.
- [8] Carver, M. J., und L. E. Thomas, 1952: Arch. Biochem. 40, 342.
- [9] Debow, S. S., 1951: Biochimija 16, 314.
- [10] Frick, G., 1949: Biochim. et Biophys. Acta 3, 103.
- [11] Gaydusek, L., 1950: Biochim. et Biophys. Acta 5, 397.
- [12] Hahn, L., und H. v. Euler, 1948: Arch. Biochem. 17, 285.
- [13] Hammarsten, O., 1924: Biochem. Z. 144, 385.
- [14] Kaufmann, B. P., H. Gay, and M. R. McDonald: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biology XIV, 85.
- [15] Kirkham, W. R., and L. E. Thomas 1953: J. biol. Chem. 200, 53.
- [16] Lang, K., und G. Siebert, 1952: Biochem. Z. 322, 360.
- [17] Lohmann, K., und L. Jendrassik, 1926: Biochem. Z. 178, 419.
- [18] Mauritzen, C. M., A. E. Roy, and E. Stedman, 1952: Proc. roy. Soc., Lond., Ser. B 140, 18.
- [19] Mayer, D. T., and A. Gulik, 1942: J. biol. Chem. (Am.) 146, 435.
- [20] Miescher, Fr., 1876: Arch. exper. Path. (D.) 37, 100.  
— 1881: Arch. Anat. u. Physiol. Anat. Abt. 195.
- [21] Mirsky, A. E., and A. W. Pollister, 1946: J. gen. Physiol. (Am.) 30, 117.
- [22] — 1947: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. Vol. XII, 143.
- [23] — and H. J. Ris, 1951: J. gen. Physiol. (Am.) 34, 475.
- [24] Sevag, M. G., E. Lackman, and J. Smolens, 1958: J. biol. Chem. (Am.) 124, 425.

- [25] Schoorl-Luff, 1936: *Z. anorgan. Chem.* **49**, 318.
- [26] Stedman, E., and E. Stedman, 1942: *Nature* **150**, 113.
- [27] — — 1943: *Nature* **152**, 267.
- [28] — — 1950: *Nature* **166**, 780.
- [29] — — 1947: *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* Vol. **XII**, 224.
- [30] Steiner, R. F., 1952: *Trans. Faraday Soc.* **48**, 1185.
- [31] Thomson, R. Y., F. C. Heagy, and J. N. Davidson, 1953: *Biochem. J.* **53/3**, 460.
- [32] Wang, W. R. Kirkham, Dallan, Mayer, and Thomas, 1951: *Zit. bei Hamer, The British Cancer V*, 130.
- [33] Zbarskij, I. B., und S. S. Debov, 1951: *Biochimija* **16**, 390.  
— — 1948: *Biochimija* **14**, 114.

# Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak.

Von

Hans Kaja

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster

Mit 5 Textabbildungen und 1 Tafel

(Eingegangen am 16. Januar 1956)

Durch Untersuchungen an jüngsten meristematischen Geweben von *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak. konnte Strugger (1953) seine bisher an *Agapanthus umbellatus* L'Hérit., *Crinum Powellii* hort., *Dracaena deremensis* Engl. und *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak. (Strugger 1950, 1951, 1954) gewonnenen Ergebnisse über die Struktur der Proplastiden in vollem Maße bestätigen. In den Blattmeristemen und in den meristematischen Zellen des Vegetationskegels lassen sich stets Proplastiden nachweisen, die aus einem amöboiden, formveränderlichen Stroma und einem mit basischen Farbstoffen intensiv färbbaren primären Granum bestehen. Da bei Kenntnis dieser Struktur der Proplastiden eine Verwechslung mit den Chondriosomen, die eine solche Differenzierung in zwei verschiedene plasmatische Systeme nicht erkennen lassen (Perner 1953a, 1953b), mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, sind die Struggerschen Befunde eine völlige Bestätigung der bereits von Schimper (1885) vertretenen Lehre von der Kontinuität der Plastiden. Sie erbrachten darüber hinaus den Nachweis der Kontinuität der beiden am Aufbau der Plastiden beteiligten Plasmasysteme (Stroma und Grana), die als genetisch wirksame Konstituenten (Plastidogene) aufgefaßt werden können (Strugger 1953, 1954).

Bei der Entwicklung der Proplastiden zu den Chloroplasten der somatischen Assimilationsgewebe erfolgt eine Vermehrung der bereits am Aufbau der Proplastiden beteiligten Plasmakonstituenten. Mit der Struktur und Entwicklung der auf diese Weise entstehenden multigranulären Chloroplasten befaßt sich eine große Zahl neuerer Arbeiten (Lit. vgl. Strugger 1953, 1954). Im Gegensatz dazu sind unsere neueren Kenntnisse über die Entwicklung und die Struktur der Leukoplasten noch recht gering. Drawert (1954) machte Versuche zur Vitalfärbung der Leukoplasten von

*Allium*-Epidermen mit Coelestinblau. Neben Leukoplasten mit stärker färbbaren „Körnchen“ fand er sowohl nach Vitalfärbung als auch im Phasenkontrast völlig homogene Leukoplasten, die keinerlei Einschlüsse enthielten. Er folgert daraus, daß es sich bei den „Körnchen“ um reversible Entmischungsprodukte, nicht aber um Primärgrana im Sinne von Strugger (1937, 1950) handelt. An dem gleichen Objekt sowie an den Staubfadenhaaren von *Tradescantia virginica* konnte dagegen Perner (1954) im Hellfeld, Dunkelfeld und im Phasenkontrast eindeutig das konstante Vorhandensein eines primären Granums in den Leukoplasten nachweisen. Bartels (1955) fand in Wurzeln von *Vicia Faba*, *Iris germanica* und *Begonia undulata* multigranuläre Leukoplasten und verfolgte deren Entwicklung aus den unigranulären Proplastiden der Wurzelspitzenmeristeme. Thaler (1955) fand in den Blattepidermen von *Helleborus corsicus* sowie in den Epidermen der Kapselwandungen junger Früchte von *Helleborus foetidus*, *H. niger* und *H. olympicus* auffällig große Leukoplasten mit einem Einschluß unbekannter Natur. Bei Behandlung mit KOH treten in den Leukoplasten Partikel auf, die Ähnlichkeit mit den Grana von *Allium cepa* und *Vicia Faba* haben.

In der nachfolgenden Arbeit sollen die Struktur und die Entwicklung der Leukoplasten in den Epidermiszellen von *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Bak. einer näheren Analyse unterzogen werden.

Für alle Untersuchungen stand eine optimale optische Ausrüstung zur Verfügung:

Ortholux der Firma Leitz mit Niedervoltlampe (6 V; 5 Amp.).

Leitz Achromat  $\frac{1}{12}$  Ölimmersion, n. A. 1,30 (100 : 1).

Leitz Fluorit  $\frac{1}{16}$  Ölimmersion, n. A. 1,32 (114 : 1).

Phasenkontrasteinrichtung mit Kondensor nach Heine.

Leitz P. v. Achromat Ölimmersion, n. A. 1,15 (90 : 1).

Hg-Höchstdrucklampe mit Brenner CS 150.

Polarisationsmikroskop CM der Firma Leitz.

P  $\frac{1}{12}$  Ölimmersion, n. A. 1,30 (100 : 1).

Aufnahmen mit Leica + Micas.

### Beobachtungen an lebenden Epidermiszellen erwachsener Blätter

Die unentbehrliche Grundlage für alle entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen bietet eine Betrachtung des lebenden, erwachsenen Materials. Zu diesem Zweck wurden Flächenschnitte von der oberen und unteren Epidermis von panaschierten und normal ergrünten Pflanzen von *Chlorophytum comosum* angefertigt. Diese wurden in eine isotonische Rohrzuckerlösung eingelegt und zur Entfernung der Interzellularenluft in einem kleinen Rezipienten an der Wasserstrahlpumpe mit der Zuckerlösung infiltriert (vgl. Strugger 1949). Da die Cuticularstrukturen die Beobachtung nur unwesentlich beeinträchtigen, konnten die Schnitte je nach der Lage der Leukoplasten mit der Schnittfläche nach oben oder nach unten in das Medium eingelegt werden, wobei im einen Falle durch das Mesophyll oder dessen Reste, im anderen durch die Cuticula hindurch die Epidermiszellen beobachtet wurden.

In Schnitten von der Unterseite erwachsener Blätter sind die Epidermiszellen annähernd rhombisch bis langgestreckt-rechteckig gestaltet. Sie haben eine Länge von 250–400  $\mu$  und eine Breite von ca. 60  $\mu$ . In diesen Zellen findet man recht leicht den Zellkern mit einem Durchmesser von 15  $\mu$ , der in einwandfrei lebendem Zustand fein granuliert ist und mehrere Nukleolen verschiedener Größe enthält. Die Zelle ist von zahlreichen Plasmasträngen durchzogen, die eine kontinuierliche Plasmaströmung erkennen lassen. In den Plasmasträngen sowie in der den Zellkern enthaltenden Plasmatasche und im Plasmawandbelag findet man überall in der Zelle Leukoplasten, die je nach den Beleuchtungsverhältnissen an der äußeren oder inneren Periklinalwand besonders zahlreich sind und oft über weite Strecken von der Plasmaströmung mitgeführt werden. Bei genauer Durchmusterung lassen sich in jeder Zelle 30–35 Leukoplasten auffinden. Diese sind von annähernd runder Gestalt und haben einen Durchmesser von 3,5–4  $\mu$ . In dem stets farblosen Stroma dieser Leukoplasten entdeckt man mit größter Regelmäßigkeit ein scheibchenförmiges Granum von 0,7–1  $\mu$  Durchmesser, das ebenfalls völlig farblos ist und je nach den Lichtbrechungsverhältnissen mehr oder weniger deutlich in Erscheinung tritt. Die Form der Leukoplasten ist im allgemeinen recht beständig. Selbst wenn sie im Plasmastrom durch die Zelle bewegt werden, verändern sie dabei ihre Form nur unwesentlich. Bei Verletzung der Zelle kommt es dagegen sehr leicht zu Formänderungen. Die Leukoplasten werden dann schwach amöboid und die Begrenzung des Stromas gegen das Cytoplasma wird undeutlich, während die Grana dabei gelegentlich besonders deutlich hervortreten können. Andererseits kann es aber auch geschehen, daß durch entsprechende Änderung des Quellungszustandes das Granum nahezu unsichtbar wird. Daß es nicht völlig verschwunden ist, lehrt die Untersuchung im Phasenkontrastmikroskop, bei der es noch stets nachweisbar ist. Durch weitgehende Annäherung der Brechungsindizes von Stroma und Grana sind die letzteren „optisch maskiert“ (vgl. Bartels, 1955), lassen sich aber bereits durch eine geringfügige Änderung der Konzentration des Außenmediums jederzeit sichtbar machen. Fig. 1 zeigt einen Ausschnitt aus einer Epidermiszelle eines erwachsenen Blattes, in der die Leukoplasten mit ihrem Granum deutlich zu erkennen sind.

Vakuolenbildung oder Stärkeeinschlüsse wurden in den Leukoplasten niemals beobachtet. Mit Rhodamin B läßt sich eine Anfärbung des Granums in lebendem Zustand erzielen, das sich dann gelegentlich — besonders bei Verwendung von Farbfiltern — noch deutlicher von dem nur schwach angefärbten Stroma abhebt. In der Regel reichen jedoch bereits die im ungefärbten Zustand vorhandenen Lichtbrechungsunterschiede völlig aus, um die Gegenwart des Granums mit Sicherheit zu erkennen.

Beobachtungen im Phasenkontrastmikroskop führen zu einer völligen Bestätigung der im Hellfeldmikroskop gewonnenen Ergebnisse. Die Leukoplasten der Epidermiszellen lassen sehr deutlich das durch einen dunklen Phasenkontrast ausgezeichnete Granum erkennen, das einem in hellerem, grauem Kontrast erscheinenden, völlig homogenen Stroma eingelagert ist.

Sehr deutlich lassen sich auch die erheblich kleineren Sphärosomen und die Chondriosomen in dem lebhaft strömenden Plasma der Zellen beobachten.

Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop erbringen besonders nachdrücklich den Beweis der Pigmentlosigkeit der Leukoplasten. Während nämlich die Plastiden des Mesophylls eine intensive Rotfluoreszenz zeigen, läßt sich in den Plastiden der Epidermis — mit Ausnahme der noch zu besprechenden Schließzellen — weder in den Grana noch im Stroma eine Spur einer auf das Vorhandensein von Chlorophyll hinweisenden Rotfluoreszenz nachweisen. Damit dürfte sichergestellt sein, daß diese Plastiden unter normalen Bedingungen kein Chlorophyll enthalten und damit als echte Leukoplasten anzusehen sind. Ob allerdings unter besonderen experimentellen Bedingungen die Leukoplasten zur Chlorophyllbildung veranlaßt werden können, läßt sich nach den bisherigen Untersuchungen nicht entscheiden. Eine experimentelle Klärung dieser Frage wäre wünschenswert und könnte einen wertvollen Beitrag zur Physiologie der Plastidenmetamorphose darstellen.

Die bereits erwähnte, relativ konstante Form der Leukoplasten in den Epidermiszellen gab fernerhin Anlaß zu polarisationsoptischen Untersuchungen, da vermutet werden konnte, daß diese Formkonstanz auf eine geordnete, möglicherweise lamelläre Struktur des Stromas zurückzuführen sein könnte. Bei der Betrachtung zwischen gekreuzten Nicols blieb jedoch das Stroma in allen Fällen dunkel und zeigte kein auf eine optische Anisotropie hinweisendes Aufleuchten. Somit dürfte die Formkonstanz der Leukoplasten wohl lediglich auf den Kolloidzustand ihres Stromas zurückzuführen sein. Die Grana zeigen in der Flächenstellung ebenfalls keine Anzeichen für eine optische Anisotropie. Im Gegensatz dazu sind die Grana in den recht seltenen Profilstellungen als deutlich leuchtende, zarte Striche im dunklen Plastidenstroma zu erkennen. Die nähere Untersuchung ergibt einen negativen Charakter der beobachteten Doppelbrechung. Zu entsprechenden Ergebnissen kam auch Böing (1953) bei polarisationsoptischen Untersuchungen an den etiolierten Plastiden von *Helodea densa*. In Übereinstimmung mit Menke (1934) und Weber (1936, 1937) kann daraus auf eine hochgeordnete, parallel zur Oberfläche der Grana verlaufende Lamellarstruktur der Grana geschlossen werden.

Die hier beschriebenen Verhältnisse gelten, wie vergleichende Untersuchungen zeigten, in gleicher Weise für die Epidermen der weißen und grünen Zonen panaschierter Blätter und für die Epidermen regelmäßig ergrünter Blätter. Abgesehen von geringen Größenschwankungen lassen sich auch zwischen der unteren und der oberen Epidermis in der Regel keinerlei Unterschiede feststellen. Lediglich bei Pflanzen, die in sehr hellem Sonnenlicht kultiviert wurden, beobachtet man in der Epidermis eine frühzeitige Degeneration der Plastiden, so daß die Zellen der oberen Epidermis älterer Blätter gelegentlich keine Plastiden mehr enthalten.

Ein erheblicher Unterschied zwischen der ober- und unterseitigen Epidermis ist jedoch durch die lediglich auf der Unterseite vorhandenen Stomata gegeben. Diese liegen in regelmäßigen Abständen zwischen den großen,

langgestreckten Epidermiszellen der Blattunterseite. Die Schließzellen haben eine Länge von etwa  $50\ \mu$  und sind je  $13\ \mu$  breit, woraus sich für den ganzen Spaltöffnungsapparat einschließlich des Spaltes eine Breite von  $30\ \mu$  ergibt. Jede der Schließzellen enthält in dichter Lagerung 12–15 Chloroplasten mit einem Durchmesser von  $5\text{--}5,5\ \mu$ , die sich schon bei schwacher Vergrößerung deutlich durch ihre Grünfärbung zu erkennen geben. Der überaus reichliche Stärkegehalt der Chloroplasten macht eine Untersuchung ihrer Struktur unmöglich, jedoch wird im Zuge der entwicklungsgeschichtlichen Betrachtung noch auf diese zurückzukommen sein.

### Beobachtungen an fixierten Epidermiszellen erwachsener Blätter

Die Fixation der Leukoplasten gelingt, sofern man einige Vorsichtsmaßregeln beachtet, mit verschiedenen Fixationsmitteln durchaus befriedigend. Dünne Flächenschnitte lassen sich nach der Räucher Methode mit Osmiumsäuredämpfen fixieren und bieten dann ein einwandfreies Fixationsbild. Die Färbbarkeit ist allerdings nach Fixation mit reiner Osmiumsäure sehr beeinträchtigt, worauf bereits Strugger (1951) hinwies. In der Quellungs-methode mit KOH nach Strugger (1951) wurde jedoch eine gute Möglichkeit zur Behebung dieser Schwierigkeit gefunden, die auch im vorliegenden Fall zu guten Resultaten führte. Nach der Fixation wurden die Schnitte in Wasser ausgewaschen und sodann 4–6 Minuten in eine 1%ige KOH-Lösung gelegt. Nach anschließendem Auswaschen mit Wasser ( $\frac{1}{2}$  Stunde) wurden die Schnitte in die Farblösung übertragen. Es ließ sich auf diese Weise feststellen, daß die Grana der Leukoplasten mit basischen Farbstoffen intensiv färbbar sind. Besonders erfolgreich waren Färbungen mit Fuchsin und Viktoriablau (1:100, Färbedauer 3–4 Stunden). Die Grana sind in allen Fällen gut erhalten und liegen als deutlich gefärbte runde Scheibchen, gelegentlich auch in der Profilansicht zu erkennen, in dem bei guter Differenzierung nur schwach angefärbten Stroma.

Für eine eingehende Untersuchung der Plastidenentwicklung ist jedoch die Anfertigung von Mikrotomschnitten nicht zu umgehen. Entsprechende Voruntersuchungen, die vor allem der Suche nach einem geeigneten Fixationsmittel dienen sollten, wurden auch an erwachsenen Blättern durchgeführt und sollen hier in Kürze beschrieben werden.

Voraussetzung für ein gutes Gelingen jeder Fixation ist ein möglichst rasches Eindringen des Fixationsmittels in die zu fixierenden Gewebe. Das erreicht man am besten mit Hilfe der Vakuuminfiltrationsmethode nach Gicklhorn und Keller (1928) (vgl. Strugger 1949), die in allen Fällen angewandt wurde. Solange man nur sehr kleine Blattstücke fixiert, lassen sich mit flüssiger Osmiumsäure recht gute Fixationsbilder erzielen. Bei etwas größeren Objekten, insbesondere aber in den kompakten Geweben der Vegetationskegel und Sproßknospen, treten jedoch oft Schwierigkeiten auf, die durch das geringe Diffusionsvermögen der Osmiumsäure bedingt sind. Auch verschiedene osmiumsäurehaltige Gemische, insbesondere die Gemische von Champy und Benda (ohne Essigsäure!) führen bei



der Fixation älterer Epidermen zu guten Ergebnissen. Dagegen treten nach Fixation mit dem Gemisch von Lewitzky sehr leicht Veränderungen verschiedener Art ein. Neben einwandfrei fixierten Stellen mit gutem Erhaltungszustand der Leukoplastenstruktur findet man nämlich andere Stellen, an denen durch die Einwirkung des Fixationsmittels die Grana aus den Leukoplasten herausgelöst werden. Die Grana sind dann vielfach gar nicht mehr aufzufinden, und an ihrer Stelle sieht man in den Leukoplasten eine Vakuole entsprechender Größe. In anderen Fällen ist die durch die Auflösung des Granums entstandene Vakuole von einem intensiv gefärbten Hof mit unregelmäßigen Konturen umgeben, wie es Fig. 2 an einem Präparat eines etwas jüngeren Materials zeigt. Möglicherweise sind es Reste der Granasubstanz, die die entstandenen Vakuolen auskleiden.

Die Paraffineinbettung erfolgte über Alkohol- und Benzolstufen. Die Färbung der Schnitte ließ sich mit den bereits oben genannten Farbstoffen sehr leicht durchführen. Die besten Ergebnisse brachte jedoch die von Strügger (1953, 1954) für den gleichen Zweck verwendete Färbung mit Säurefuchsin nach Altmann (Romeis 1948). Der Vorteil der Altmannschen Färbung beruht insbesondere auf ihrer überaus scharfen Differenzierbarkeit. Es erwies sich jedoch als zweckmäßig, die Färbung etwas schonender durchzuführen, als in dem ursprünglichen Rezept angegeben. Das Prinzip der Färbung besteht darin, daß die Schnitte auf dem Objektträger zunächst unter Einwirkung von Wärme stark überfärbt werden und dann in einer extrem sauren Lösung von Pikrinsäure in verdünntem Alkohol differenziert werden. Entsprechende Messungen mit der Glaselektrodenkette des Ionometers der Fa. Püsl ergaben für die Pikrinsäurelösung I einen pH-Wert von 1,5 und für die Lösung II einen pH-Wert von 1,65. Diese extreme Behandlung läßt sich, ohne den Erfolg zu gefährden, dahingehend abwandeln, daß man die Färbung unter schonender Wärmeanwendung im Thermostaten (60°, 30 Minuten) durchführt, wie es Strügger (1953) vorschlug, und sodann in einer stark verdünnten Pikrinsäurelösung differenziert. In den Vorversuchen erwies es sich als zweckmäßig, die Pikrinsäurelösung mit Wasser mindestens auf das fünf- bis zehnfache Volumen mit Wasser zu verdünnen. Dadurch wird zugleich die Differenzierungszeit verlängert, und es lassen sich viel feinere Abstufungen der Färbung erzielen. Es empfiehlt sich, das Differenzieren unter ständiger mikroskopischer Kontrolle durchzuführen, da sich auf diese Weise der Prozentsatz brauchbarer Präparate erheblich steigern läßt. Bei gut gelungener Färbung ist das Leukoplastenstroma schwach rosa gefärbt und enthält ein intensiv dunkelrot gefärbtes Granum. Der Zellkern ist ebenfalls nur schwach gefärbt und enthält dunkelrot gefärbte Nukleoli. Die Sphärosomen und Chondriosomen sind bei diesem Grad der Differenzierung in der Regel nicht mehr zu erkennen. In Kanadabalsam behalten die Präparate für einige Zeit ihre Färbung bei, die jedoch nicht ganz lichtecht ist und daher auf die Dauer ausbleicht. Durch eine Nachbehandlung der Präparate mit einer 1,5%igen  $\text{SnCl}_2$ -Lösung (vgl. Kaja 1954) läßt sich jedoch die Haltbarkeit der Präparate erheblich verbessern.

### Beobachtungen an fixierten Geweben der Vegetationskegel und der jungen Blätter von *Chlorophytum comosum*

Zum besseren Verständnis der Verhältnisse in der Epidermis wurde eine entwicklungsgeschichtliche Untersuchung durchgeführt, deren charakteristische Abschnitte im folgenden beschrieben werden sollen. Die Beobachtungen mußten an fixiertem Material vorgenommen werden, da die jungen Vegetationskegel und jüngsten Blattanlagen einer Vitalanalyse kaum zugänglich sind. Auf Grund der an erwachsenen Blättern gewonnenen Erfahrungen wurde die Verwendung reiner Osmiumsäure vermieden. Sie führt in den Vegetationskegeln zu intensiven, die Beobachtung sehr störenden Schwärzungen und beeinträchtigt darüber hinaus die nachfolgende Anfärbung sehr. Die bei den erwachsenen Blättern festgestellte günstige Wirkung des Champyschen Gemisches kann für die embryonalen Gewebe nicht bestätigt werden. Soweit wirklich einmal gute Fixationsergebnisse erzielt wurden, waren diese meist lokal sehr begrenzt. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Osmiumsäure bleibt nämlich in den kompakten Geweben hinter derjenigen der übrigen Komponenten des Fixationsgemisches zurück, und es ergibt sich ein Fixationsbild, das etwa der Wirkung eines Chromsäure-Kaliumbichromat-Gemisches entspricht. In dieser Hinsicht hat das Gemisch nach Lewitzky eine wesentlich gleichmäßigere Wirkung und bewährte sich im Gegensatz zur Fixation der älteren Gewebe bei Vegetationskegeln und jungen Blattanlagen sehr gut (vgl. Strügger 1953).

Zur Fixation wurden die Vegetationskegel in der Längsrichtung halbiert. Dadurch entsteht eine größere Diffusionsfläche für das Fixationsmedium, dessen Eindringen in das Gewebe durch Infiltration mit Hilfe der Wasserpumpe erheblich beschleunigt werden kann. Nach 12- bis 24stündigem Verweilen im Fixationsgemisch wurde das Material ausgewaschen und über Alkohol- und Benzolstufen in Paraffin eingebettet. Die je nach dem Alter der zu untersuchenden Gewebe zwischen  $4\mu$  und  $10\mu$  variierenden Schnitte wurden, wie oben beschrieben, mit Säurefuchsin nach Altmann gefärbt. Neben einer geringeren Zahl eigener Präparate stand mir für die Untersuchungen auch die überaus reiche Sammlung zur Verfügung, die als Grundlage für die Arbeit von Strügger (1953) gedient hatte<sup>1</sup>.

Abb. 1 zeigt einen Vegetationskegel von *Chlorophytum comosum*, wie er in einer größeren Zahl von Präparaten vorlag. Es sind daran diejenigen Stellen markiert worden, an denen die hauptsächlichen Untersuchungen vorgenommen wurden:

1. Dermatogeninitialen des Vegetationskegels,
2. Protodermzellen jüngster Blattanlagen,
3. Epidermiszellen älterer Blattanlagen, Entstehung der Spaltöffnungs-Mutterzellen,
4. Phase der Zellstreckung und Differenzierung,
5. Ausbildung des Spaltöffnungsapparates.

<sup>1</sup> Für die freundliche Überlassung dieses wertvollen und äußerst aufschlußreichen Materials möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. S. Strügger meinen verbindlichsten Dank sagen.

## 1. Dermatogeninitialen des Vegetationskegels

Die Untersuchungen im Bereich des Vegetationskegels bereiten erhebliche Schwierigkeiten, weil hier die Fixationsmittel nur sehr schwer eindringen und deshalb nur gelegentlich völlig einwandfrei fixierte Stellen vorgefunden werden. Die Färbung und Differenzierung muß in diesem Bereich mit besonderem Feingefühl durchgeführt werden, da sehr leicht durch zu starke oder zu schwache Färbungen der Erfolg in Frage gestellt werden kann. Außerdem sind die Zellen nur sehr klein und weitgehend vom Zellkern erfüllt, so daß die anderen Organelle nur selten frei neben dem Zellkern aufgefunden werden können. Trotz dieser Schwierigkeiten ge-

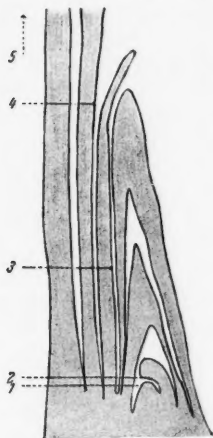


Abb. 1. Längsschnitt durch einen Vegetationskegel von *Chlorophytum comosum*. Es wurden diejenigen Stellen bezeichnet, an denen die hauptsächlichen Untersuchungen vorgenommen wurden. Erklärung vgl. Text.

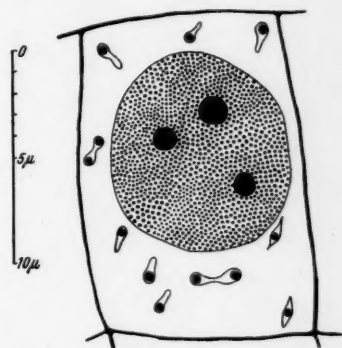


Abb. 2. Darstellung einer Dermatogenzelle aus dem Vegetationskegel von *Chlorophytum comosum*. Neben dem großen Zellkern erkennt man im Plasma viele kleine Proplastiden, die stets ein Primärgranum enthalten. Unterhalb und links des Kernes je ein Teilungsstadium.

lang es bereits Strugger (1953), in den Zellen des Vegetationskegels das Vorhandensein von Proplastiden einwandfrei nachzuweisen und mikrophotographisch zu belegen. In eigenen Versuchen ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit dieser Befunde.

In diesem Zusammenhang interessierten besonders die Verhältnisse in den Dermatogenzellen des Vegetationskegels, denen deshalb besondere Beachtung geschenkt wurde. Oft gelingt es erst nach vielen vergeblichen Bemühungen, eine für die Untersuchung geeignete Gruppe von Dermatogenzellen unmittelbar am Scheitel des Vegetationskegels zu finden. Die Zellen haben eine mittlere Größe von  $12 \times 18 \mu$ . Sie werden weitgehend vom dem Zellkern mit einem Durchmesser von  $10-12 \mu$  eingenommen. Die Pro-

plastiden liegen zum Teil über dem Kern oder werden von diesem verdeckt, einige liegen jedoch auch in dem umgebenden Cytoplasma. Dort lassen sich gelegentlich auch einige, allerdings nur sehr schwach gefärbte Chondriosomen erkennen. Abb. 3 zeigt eine Dermatogenzelle aus einem nach den beschriebenen Methoden hergestellten Präparat. Darin sind neben dem Zellkern deutlich drei Proplastiden in ihrer charakteristischen Gestalt zu erkennen (vgl. auch Abb. 2). Messungen ergaben für diese Proplastiden eine Länge von  $1,3-1,8 \mu$ , während die Breite selten größer ist als der Durchmesser des Granums, der etwa  $0,4 \mu$  beträgt. Daraus ergibt sich zwangsläufig die Gestalt der Proplastiden. Sie sind entweder trommelschlegelförmig, das Granum liegt dann polar an einem der beiden Enden des Proplastids,



Abb. 3. Formen der Proplastiden aus den Dermatogenzellen des Vegetationskegels von *Chlorophytum comosum*. Links trommelschlegelförmig, Mitte spindelförmig, rechts hantelförmige Teilungsstadien.

oder sie sind mehr oder weniger spindelförmig, wobei dann das Granum etwa in der Mitte des Proplastids liegt. Diese Verhältnisse sind in Abb. 3 an typischen Proplastidengruppen dargestellt.

Bei genauer Durchforschung der Präparate findet man auch immer wieder Proplastiden, die zwei Grana enthalten und sich durch ihre mehr oder weniger starke hantelförmige Einschnürung deutlich als Teilungsstadien

ausweisen. Auch hier ergibt sich die Gestalt der Proplastiden weitgehend aus der jeweiligen Lage der beiden Grana.

Neben den durch den Besitz von einem oder zwei Grana ausgezeichneten Proplastiden findet man in den Präparaten auch Chondriosomen. Diese enthalten kein Granum und sind erheblich kleiner als die Proplastiden. Durch die unterschiedliche Färbbarkeit dieser beiden Organellsysteme sind in der Regel entweder nur die Proplastiden oder aber die Chondriosomen optimal sichtbar. Wenn die Proplastiden richtig gefärbt sind, so daß in dem Stroma das Granum durch seine intensivere Färbung deutlich zu erkennen ist, sind die Chondriosomen so schwach gefärbt, daß sie kaum noch zu entdecken sind; andererseits sind bei optimaler Färbung der Chondriosomen die Proplastiden so stark überfärbt, daß die Grana sich nicht mehr von dem nun gleichfalls intensiv roten Stroma abheben. Bei aufmerksamem Suchen ist es jedoch in vielen Fällen möglich, beide Organellsysteme nebeneinander im gleichen Präparat nachzuweisen. An dem parallelen und unabhängigen Vorkommen beider Organellsysteme in den jüngsten meristematischen Zellen kann somit kein Zweifel mehr bestehen.

## 2. Protodermzellen jüngster Blattanlagen

Während in den Zellen des Vegetationskegels überall nahezu das gleiche, oben beschriebene Bild gefunden wurde, beginnt bereits in den Meristemen der jungen Blattanlagen ein gewisser Unterschied zwischen den zukünftigen

Epidermiszellen, den Protodermzellen und den Mesophyllzellen hervorzutreten. Da die Zellen bereits etwas herangewachsen sind ( $25 \times 10 \mu$ ), findet man die Proplastiden nun nicht mehr nur in der Nähe des Zellkernes, sondern auch in dem hier erheblich vergrößerten Plasmaraum, wo sie sich recht gut beobachten und mikrophotographisch belegen lassen (Fig. 4). Die jungen Protodermzellen enthalten langgestreckte, spindel- bis trommelschlegelförmige Proplastiden, die bis zu  $2,5 \mu$  lang sein können, während die Breite wieder durch die Lage und den Durchmesser des Granums festgelegt ist. Die durchschnittliche Proplastidenzahl der Zellen beträgt etwa 20. Oft findet man in den Zellen hantelförmige Teilungsstadien, die kurz vor der Zellteilung zur endgültigen Durchschnürung kommen und sich dann, wie es Strugger (1953) beschreibt, statistisch auf die beiden Tochterzellen verteilen.

In den Mesophyllzellen der Blattbasen sind die Proplastiden gewöhnlich größer als in den Protodermzellen. Man findet hier Proplastiden mit einem Durchmesser bis zu  $3,5 \mu$ . Außerdem scheinen hier die Proplastiden erheblich stärker amöboid zu sein, was durch die bedeutend vielgestaltigeren Formen (vgl. Strugger 1953, Abb. 4) deutlich gemacht wird.

### 3. Epidermiszellen älterer Blattanlagen, Entstehung der Spaltöffnungsmutterzellen

Die nun folgende Phase ist durch die Entstehung der Spaltöffnungsmutterzellen gekennzeichnet. Kurz vor der Zellteilung, die zur Ausbildung der Spaltöffnungsmutterzellen führt, haben die Epidermiszellen eine Länge von etwa  $60 \mu$  und eine Breite von  $20-25 \mu$ . In dem gewaltig vergrößerten Plasmaraum lassen sich nun überall sehr leicht die Proplastiden auffinden. Fig. 5 gibt einen Eindruck einer solchen Zelle. Die Proplastiden sind auf etwa  $3 \mu$  herangewachsen und sind in sehr vielgestaltigen Formen überall in der Zelle zu erkennen; Teilungsstadien wurden jedoch verhältnismäßig selten beobachtet. Das dürfte mit dem allmählichen Nachlassen der Zellteilungstätigkeit zusammenhängen. Die zur Bildung der Spaltöffnungsmutterzellen führende Zellteilung ist inäqual. Bereits vorher beobachtet man, daß der Zellkern sich einer der Antiklinalmembranen nähert, wodurch bereits die Lage der zukünftigen Teilungsebene angedeutet wird. Bei der bald darauf eintretenden Zellteilung entstehen aus den oben beschriebenen Zellen einerseits die Spaltöffnungsmutterzellen von  $8-10 \times 20 \mu$  und andererseits die Epidermiszellen von  $40 \times 20 \mu$ . Die Spaltöffnungsmutterzellen sind anfangs so schmal, daß der Zellkern nur in einer langgestreckten Zwangsform darin Platz findet und die Zelle nahezu ausfüllt. Es ist daher äußerst schwierig, in diesen Zellen die Proplastiden aufzufinden und mikrophotographisch zu belegen. Lediglich Schnitte, die den Kern nur tangential erfassen, ermöglichen eine Untersuchung der Proplastiden in diesen Zellen. Fig. 6 zeigt einen Teil eines solchen Schnittes, in dem zwischen zwei Epidermiszellen eine Spaltöffnungsmutterzelle liegt. In dieser ist eines der Proplastiden sehr deutlich zu erkennen, während einige weitere mehr oder weniger verdeckt noch eben sichtbar sind. Die Gesamtzahl der Proplastiden

in diesen Zellen läßt sich wegen der engen Raumverhältnisse nur sehr schwer ermitteln, sie ist jedoch nach den vorliegenden Beobachtungen geringer als in den Epidermiszellen. Auch in dieser Hinsicht scheinen somit die zur Bildung der Spaltöffnungsmutterzellen führenden Zellteilungen inäqual zu sein.

#### 4. Phase der Zellstreckung und Differenzierung

Die Ausbildung der Spaltöffnungsmutterzellen kennzeichnet zugleich das Einsetzen des Streckungswachstums und der Zelldifferenzierung und damit auch die Beendigung der Teilungstätigkeit. Lediglich die Teilung

der Spaltöffnungsmutterzellen in die beiden Schließzellen zögert sich noch einige Zeit hinaus.

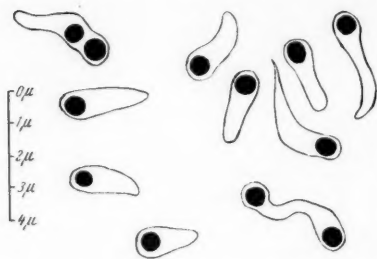


Abb. 4. Ausschnitt aus einer Epidermiszelle von *Chlorophytum comosum* mit einer typischen Gruppe amöboid beweglicher Leukoplasten.

Die Epidermiszellen nehmen erheblich an Größe zu und erreichen bald eine Länge von  $150\ \mu$  und eine Breite von  $30\text{--}40\ \mu$ . Die Ausbildung der Cuticula wird in den Blattquerschnitten an der Fältelung der äußeren Zellmembranen erkennbar. Das Anwachsen der Zellsaftvakuole tritt dadurch in Erscheinung, daß die Plastiden mehr und mehr in der unmittelbaren Nähe der Zellmembranen, also im plasmatischen Wandbelag der Zellen,

gefunden werden. In vielen Fällen erweist es sich daher als zweckmäßig, zur Beobachtung nicht wie bisher Querschnitte, sondern Flächenschnitte heranzuziehen, in denen die Plastiden dicht unter der Zellmembran in großer Zahl beisammenliegend angetroffen werden können. Die Plastiden sind äußerst formveränderlich und zeigen oftmals lange amöboide Fortsätze (Abb. 4). Die Messungen ergeben eine Länge von  $3\text{--}4\ \mu$  bei einer Breite von  $1\text{--}1,5\ \mu$ . In diesen Plastiden findet man stets ein Granum von  $0,8\text{--}1\ \mu$  Durchmesser. Stärkebildung läßt sich auch in diesem Stadium nicht nachweisen; auch Vakuolen sind in den Plastiden dieses Alters nur ausnahmsweise zu finden.

Nicht selten findet man auch Plastiden, die zwei oder auch mehr Grana enthalten, die in ihrer Größe auffällig verschieden sind (Fig. 7). Die für die Plastidenteilungen so charakteristischen hantelförmigen Stadien konnten jedoch niemals nachgewiesen werden. Zählungen ergaben, daß die Plastidenzahl konstant  $30\text{--}35$  beträgt, wie es auch in den erwachsenen Epidermiszellen der Fall ist, wo man ebenfalls gelegentlich derartige „multi-granuläre“ Plastiden finden kann. Wahrscheinlich ist in diesen Fällen die Beendigung des Teilungswachstums von Grana und Stroma nicht vollständig synchronisiert. So können sich gelegentlich nach Einstellung der Teilungstätigkeit des Plastidenstroms die Grana noch einmal teilen, und



nicht selten kommt es bei den Tochtergrana oder wenigstens bei einem derselben zu nochmaligen Teilungen. Im letzteren Fall führen diese Teilungen zur Bildung von Tochtergrana mit stufenweise geringer werdender Größe, wie es in Abb. 5 dargestellt ist. Die Genese dieser multigranulären Plastiden kann man sich wie folgt vorstellen: Ausgehend von dem ursprünglichen Granum A entstehen bei der ersten Teilung die Tochtergrana B und B'. Bei der nächsten Teilung entstehen aus dem Granum B' die Tochtergrana C und C', während B ungeteilt bleibt. Eine weitere Teilung läßt schließlich aus dem Granum C' die Tochtergrana D und D' entstehen. Somit sind in einem Plastid drei aufeinanderfolgende Grana-generationen zu finden, die sich durch ihre unterschiedliche Größe leicht identifizieren lassen. Unabhängig von der Richtigkeit dieser hypothetischen Annahme lassen sich jedoch die beschriebenen Erscheinungen mit gutem Recht als eine Hemmung der normalen Teilungstätigkeit ansehen und lassen deutlich den zunehmenden somatischen Charakter der Plastiden und damit auch der Gewebe erkennen. Da sich die Plastiden durch den Verlust ihres Teilungsvermögens und auch durch ihre Größe deutlich von den Proplastiden der meristematischen Gewebe unterscheiden, erscheint es berechtigt, hier den Übergang zu den somatischen, pigmentlosen Plastiden zu sehen, die nun mit Recht den Namen Leukoplasten verdienen.

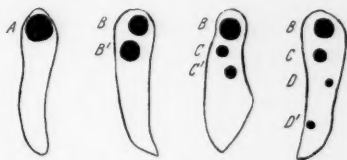


Abb. 5. Schema der Entstehung „multigranulärer“ Leukoplasten. Das Granum A teilt sich in die Tochtergrana B und B'. B' teilt sich erneut in C und C'. C' wiederum in D und D'.

Im Zuge des Streckungswachstums haben auch die Spaltöffnungsmutterzellen an Größe zugenommen. Sie haben jetzt eine Länge von  $30\mu$  und eine Breite von  $25\mu$ . Auf Grund dieser veränderten Größenverhältnisse kann nun der Kern wieder eine annähernd runde Gestalt annehmen, und es bereitet jetzt erhebliche geringere Schwierigkeiten, die im Cytoplasma dieser Zellen vorhandenen Plastiden zu beobachten. Diese sind inzwischen ebenfalls herangewachsen, ohne jedoch die Größe der in den Epidermen beobachteten Plastiden zu erreichen. Meist findet man 7–12 unigranuläre Plastiden vor, deren Maße  $2,5 \times 1,5\mu$  sind. Fig. 8 zeigt einen Querschnitt durch eine diesen Beschreibungen entsprechende Zelle.

Die gleichzeitige Beobachtung der Plastiden im Mesophyll stößt von diesem Zeitpunkt an in fixiertem Material häufig auf Schwierigkeiten, da sich nun auch die färberischen Unterschiede zwischen der Epidermis und dem Mesophyll stärker als bisher bemerkbar machen, so daß man gewöhnlich nur noch entweder im Mesophyll oder in der Epidermis eine zur Beobachtung geeignete Färbung erzielen kann. Die an geeigneten Stellen im Mesophyll beobachteten Plastiden haben einen Durchmesser von  $4\text{--}4,5\mu$  und sind bereits multigranulär.



### 5. Ausbildung des Spaltöffnungsapparates

Nachdem im allgemeinen die Zellteilungstätigkeit in den Epidermen längst beendet ist und die Epidermiszellen bereits in die Phase der Zellstreckung eingetreten sind, folgt als letzter Entwicklungsschritt die Teilung der Spaltöffnungsmutterzellen in die Schließzellenpaare. Wenn auch in den Mutterzellen die Kernteilungsfigur räumlich sehr beengt ist und die Plastiden häufig von ihr überdeckt werden, läßt sich bei sorgfältiger Untersuchung doch feststellen, daß die ursprünglich in der Mutterzelle enthaltenen 12—15 Plastiden sich nach vorheriger Teilung nahezu gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen, die künftigen Schließzellen verteilen. In den Schließzellen setzt sehr bald ein rasches Wachstum der Plastiden ein, das nur ausnahmsweise noch einmal von einer Plastidenteilung unterbrochen wird. Dadurch erreichen sie bald eine Größe von etwa  $3\mu$ . Sie verlieren ihre bisher noch stets vorhandene Amöboidie und nehmen eine mehr oder weniger runde Gestalt an. Hatten diese Plastiden bisher nur ein Granum, so findet nun innerhalb kürzester Zeit eine Vermehrung der Granazahl statt. Zur gleichen Zeit setzt auch, wie Untersuchungen an lebendem Material zeigen, der Ergrünungsprozeß ein, so daß die Plastiden im Fluoreszenzmikroskop eine blutrote Fluoreszenz zeigen. Außerdem beginnt aber auch eine sehr intensive Stärkebildung, wobei durch das Auftreten äußerst zahlreicher Stärkeschollen die Beobachtung der einzelnen Entwicklungsschritte ein nahezu aussichtsloses Unternehmen wird. Mit Sicherheit läßt sich lediglich nachweisen, daß die in den Schließzellen vorhandenen Chloroplasten stets multigranulär sind.

In den Epidermiszellen sind die Leukoplasten auch jetzt noch häufig schwach amöboid, aber es macht sich eine zunehmende Tendenz zur Stabilisierung der Formen bemerkbar. Es tritt Abrundung der Leukoplasten ein, wobei der Durchmesser der Plastiden etwa  $3,5\mu$  beträgt. Mit größter Konstanz ist in allen Leukoplasten mindestens ein Granum nachweisbar, in den beschriebenen Sonderfällen auch zwei bis vier.

Damit ist sowohl in den Epidermiszellen als auch in den Schließzellen das zu Beginn dieser Arbeit beschriebene Stadium der somatischen Leukoplasten bzw. Chloroplasten erreicht.

### Diskussion

Wie die beschriebenen Untersuchungen zeigen, enthalten die erwachsenen Epidermiszellen voll entwickelter Blätter von *Chlorophytum comosum* stets große, farblose Leukoplasten ohne irgendwelche Pigmenteinlagerungen. An lebenden Zellen im Hellfeld-, Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskop sowie an fixiertem Material durchgeführte Untersuchungen lassen erkennen, daß diese Leukoplasten in ihrem Stroma mit größter Regelmäßigkeit mindestens ein Granum enthalten. In lebendem Material lassen sich diese Grana mit Rhodamin B in fixiertem Material mit verschiedenen basischen Farbstoffen, besonders gut mit Fuchsin und Viktoriablau sowie mit Säurefuchsin nach Altmann, deutlich und elektiv anfärben.

Dadurch ist eindeutig erwiesen, daß die Grana — in Ein- oder Mehrzahl — ein spezifischer, persistenter Baustein der Leukoplasten sind. Zu entsprechenden Ergebnissen kommt auch Perner (1954) durch Untersuchungen an Epidermiszellen von *Allium cepa* und an den Staubfadenhaaren von *Tradescantia virginica*.

Durch wechselnden Quellungszustand kann das Granum sich gelegentlich der Beobachtung im Hellfeld entziehen, sofern dabei die Lichtbrechungsindizes von Stroma und Grana sehr ähnlich werden. Die Grana sind dann „optisch maskiert“ (Bartels 1955). Auch in diesen Fällen lassen sich aber im Phasenkontrastmikroskop die Grana sichtbar machen. Andererseits genügt, wie bereits erwähnt wurde, eine geringfügige Änderung der Konzentration des umgebenden Mediums, um auch für eine Hellfeldanalyse geeignete Lichtbrechungsverhältnisse herbeizuführen. Diese Tatsache berechtigt jedoch keineswegs dazu, die Grana als „reversible Entmischungsprodukte“ im Sinne von Drawert (1954) anzusehen. Alle Tatsachen, insbesondere die mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops, des Polarisationsmikroskops und an Hand fixierten Materials erhaltenen Ergebnisse sprechen ausnahmslos dafür, daß es sich bei den Grana um spezifische, persistente Konstituenten der Leukoplasten handelt, die nach den polarisationsoptischen Untersuchungen einen hochgeordneten lamellären Aufbau aufweisen.

Die durchgeführten entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen zeigen eindeutig, daß sich die somatischen Leukoplasten der Blattepidermen unmittelbar von den Proplastiden der meristematischen Gewebe des Vegetationskegels ableiten lassen. In entsprechender Weise konnte Bartels (1955) in den Wurzelmeristemen von *Vicia Faba* und *Iris germanica* die Metamorphose der Proplastiden zu den somatischen Leukoplasten der Wurzeln beobachten. Die hier wie dort aufgezeigten Tatsachen sprechen eindeutig für die Kontinuität der Plastiden im Sinne von Schimper (1885). Die in den Dermatogeninitialen des Vegetationskegels aufgefundenen Proplastiden gleichen in jeder Hinsicht den von Strugger (1953) aus den Meristemen und Postmeristemen beschriebenen Proplastiden. Als kleinstmögliche Plastideneinheit bestehen sie selbst in den jüngsten, meristematischen Zellen aus den beiden charakteristischen Konstituenten, dem Stroma und dem Primärgranum. Dadurch ist, wie bereits Strugger (1953, 1954) hervorhob, eine einwandfreie Abgrenzung von den Chondriosomen möglich. Im Verlaufe der sehr rasch aufeinanderfolgenden Zellteilungen wird durch ständiges Wachstum und darauffolgende Teilung beider am Aufbau der Plastiden beteiligten plasmatischen Systeme die Kontinuität aufrechterhalten. Beide Konstituenten, Stroma und Grana, sind ausnahmslos in allen Plastiden meristematischer Zellen nachweisbar. Auf Grund dieser Tatsachen hat Strugger (1950) die Ansicht vertreten, daß sowohl das Stromaplasma als auch das Plasma des Primärgranums als Träger genetisch wirksamer Konstituenten aufgefaßt werden können und diese Ansicht in späteren Arbeiten gefestigt und eingehend diskutiert. Heitz und Maly (1953) kommen auf Grund ihrer Untersuchungen an

*Agapanthus umbellatus* zu abweichenden Resultaten. Das Primärgranum soll erst im Verlaufe der Ergrünungsmetamorphose aus dem Stromaplasma *de novo* entstehen, vor dem Ergrünen jedoch nicht vorhanden sein. Zugleich wird die identische Reduplikation des Primärgranums abgelehnt. Lediglich Stroma und Plastidenhaut sollen stets vorhanden sein. Strugger (1953, 1954) hat diese Einwände an Hand von Tatsachen eingehend diskutiert und widerlegt. Auch aus den vorliegenden Untersuchungen können die von Strugger vertretenen Ansichten vollauf bestätigt werden. Insbesondere zeigt das Studium der Leukoplasten, die ja in der Regel kein Chlorophyll auszubilden pflegen, daß die Primärgrana nicht erst im Zuge des Ergrünungsprozesses entstehen, wie Heitz und Maly annehmen, und auch kein „kristallisiertes Chlorophyll“ darstellen, wie Heitz (1955) meint. In keinem Falle kann und darf die Chlorophyllbildung als Ursache einer „Granabildung“ im Sinne von Heitz angesehen werden,

#### Tafel I.

Fig. 1. Ausschnitt aus einer erwachsenen Epidermiszelle von *Chlorophytum comosum*. Es sind zwei gut fixierte Leukoplasten zu erkennen, rechts mit einem Granum, links mit zwei Grana. Handschnitt, fixiert mit  $\text{OsO}_4$ -Dämpfen, gefärbt mit Fuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

Fig. 2. Ausschnitt aus einer nahezu erwachsenen Epidermiszelle. Schlechte Fixation der Leukoplasten (Lewitzky). Die Grana sind herausgelöst, die entstandenen Vakuolen sind von einem Hof stark färbbarer Substanz umgeben. Mikrotomschnitt, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

Fig. 3. Eine Dermatogenzelle aus dem Vegetationskegel von *Chlorophytum comosum*. Unterhalb des Zellkernes zwei Proplastiden, links vom Kern ein Proplastid mit deutlich durch stärkere Färbung hervorgehobenem Primärgranum. Mikrotomschnitt, fixiert mit Lewitzky, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

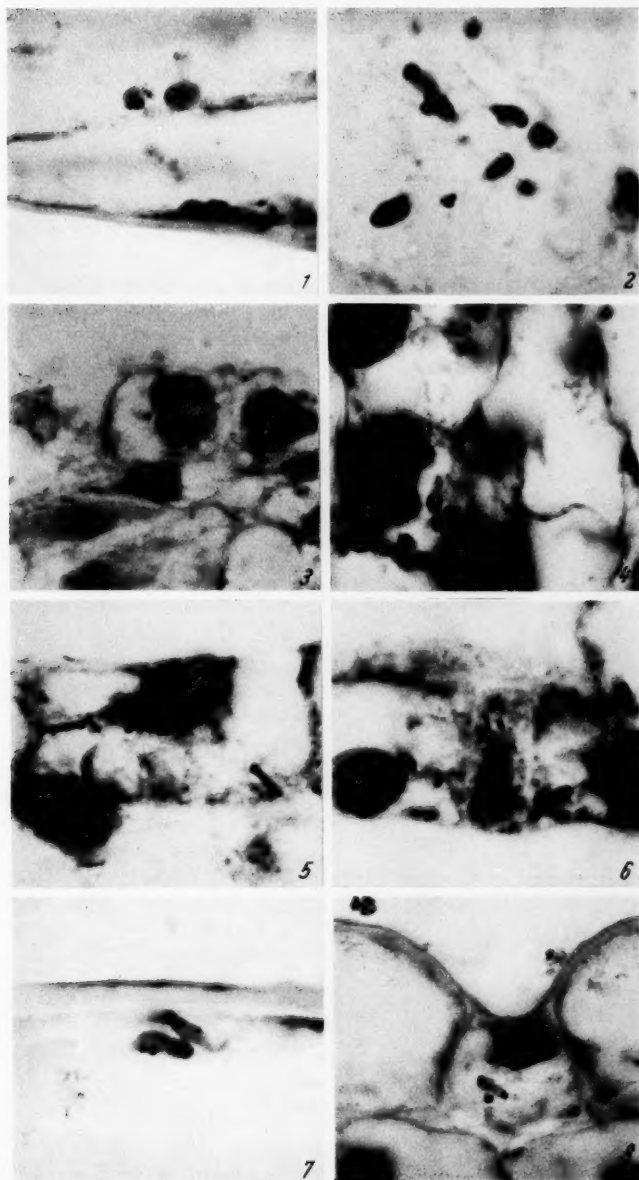
Fig. 4. Protodermzelle aus einer sehr jungen Blattanlage. Rechts neben dem Zellkern sind mehrere Proplastiden mit stark gefärbtem Primärgranum zu erkennen. Mikrotomschnitt, fixiert mit Lewitzky, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

Fig. 5. Epidermiszelle einer älteren Blattanlage kurz vor der Ausbildung der Spaltöffnungsmutterzellen mit mehreren Proplastiden, deren Granum durch stärkere Färbung hervorgehoben ist. Mikrotomschnitt, fixiert mit Lewitzky, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

Fig. 6. Eine Spaltöffnungsmutterzelle zwischen zwei Epidermiszellen. In der Spaltöffnungsmutterzelle erkennt man oben links über dem Kern ein scharf eingestelltes Proplastid. Mikrotomschnitt, fixiert mit Lewitzky, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

Fig. 7. Teil einer nahezu erwachsenen Epidermiszelle mit zwei Leukoplasten, die eine erhöhte Granazahl erkennen lassen. Mikrotomschnitt, fixiert mit Benda, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.

Fig. 8. Spaltöffnungsmutterzelle kurz vor der Teilung in die Schließzellenpaare. Die Ausgestaltung der Epidermis läßt den bereits fortgeschrittenen Differenzierungszustand erkennen. Unterhalb des Zellkernes ist ein Proplastid mit zwei Grana zu erkennen, das kurz vor der Teilung steht. Mikrotomschnitt, fixiert mit Benda, gefärbt mit Säurefuchsin. Vergr.: 1100 : 1.



sie ist lediglich eine physiologische Funktion des in allen Stadien meristematischer Gewebe kontinuierlich nachweisbaren primären Granums, die bei der Metamorphose zu den assimilationstüchtigen Chloroplasten zutage tritt.

### Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Epidermiszellen erwachsener Blätter von *Chlorophytum comosum* enthalten große, pigmentlose Leukoplasten, deren Struktur *in vivo* und in fixiertem Material untersucht wird. In den Leukoplasten findet man stets mindestens ein Granum von scheibchenförmiger Gestalt, das in Profilstellung eine deutliche Doppelbrechung zeigt, woraus auf einen geordneten lamellären Aufbau geschlossen werden kann. In fixiertem Material läßt sich das Granum mit basischen Farbstoffen sowie mit Säurefuchsin nach Altmann intensiv anfärben.

2. Nach Fixation mit dem Gemisch von Lewitzky und Färbung mit Säurefuchsin nach Altmann läßt sich an Mikrotomschnitten von Vegetationskegeln und jungen Blattanlagen die Entwicklung der Leukoplasten verfolgen.

3. Die Dermatogeninitialen des Vegetationskegels enthalten sehr kleine, meist spindel- oder hantelförmige Proplastiden, die stets aus Stroma und einem primären Granum bestehen. Bei Teilungsstadien findet man zwei Grana, die auf die beiden Tochterplastiden verteilt werden. Durch morphologische und färberische Unterschiede ergibt sich eine einwandfreie Abgrenzung von den Chondriosomen.

4. Bereits in den jüngsten Blattanlagen lassen sich an Hand der Größe der Plastiden entwicklungsgeschichtliche Unterschiede zwischen den zukünftigen Epidermis- und Mesophyllzellen ermitteln, die im Verlaufe der späteren Entwicklungsphasen in zunehmendem Maße zu beobachten sind. Auf allen Stadien enthalten die Epidermiszellen unigranuläre Plastiden, so daß die Kontinuität der Grana und des Stromas keinem Zweifel mehr unterliegen kann.

5. Die Plastiden der Stomata zeigen eine abweichende Entwicklung. Die Spaltöffnungsmutterzellen enthalten wie die Epidermiszellen, aus denen sie hervorgegangen sind, unigranuläre Proplastiden, die nach Ausbildung der beiden Schließzellen zu multigranulären, chlorophyllführenden Chloroplasten werden.

6. Die Kontinuität der Plastiden (Schimper) sowie die Kontinuität von Stroma und Grana (Strugger) werden erneut bestätigt.

### Literatur

- Bartels, F., 1955: Cytologische Studien an Leukoplasten unterirdischer Pflanzenorgane. *Planta* 45, 426.  
 Böing, J., 1953: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Chloroplasten. Diss. Münster.  
 Drawert, H., 1954: Vitalfärbung der Plastiden von *Allium cepa* mit Coelestinblau. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 67, 33.

- Heitz, E., 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. *Exper. Cell Res.* 7, 606.
- Heitz, E., und R. Maly, 1953: Zur Frage der Herkunft der Grana. *Z. Naturforsch.* 8b, 245.
- Kaja, H., 1954: Untersuchungen über die Chromatophoren und Pyrenoide der *Anthocerotales*. *Protoplasma* 44, 156.
- Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle. Jena.
- Menke, W., 1954: Chloroplastenstudien. *Protoplasma* 21, 279.
- Meyer, A., 1883: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig.
- Perner, E. S., 1953: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 42, 457.
- 1954: Zum mikroskopischen Nachweis des „primären“ Granums in den Leukoplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 67, 25.
- und G. Pfefferkorn, 1953: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop. *Flora* 140, 98.
- Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. München.
- Schimper, A. W. F., 1885: Die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Ztg.* 41, 105, 121, 137, 153.
- 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. *Jb. wiss. Bot.* 16, 1.
- Stöhr, A., 1879: Über das Vorkommen von Chlorophyll in der Epidermis der Phanerogamen-Laubblätter. *Sber. Akad. Wien, Math.-naturw. Kl., Abt. I.* 79.
- Strugger, S., 1936: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. *Flora* 131, 113.
- 1936: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. *Flora* 131, 324.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl., Heidelberg.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturw.* 37, 166.
- 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 64, 69.
- 1953: Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 66, 439.
- 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. *Protoplasma* 43, 120.
- Thaler, I., 1955: Die Leukoplasten von *Helleborus*. *Protoplasma* 44, 437.
- Weber, F., 1936: Doppelbrechung und Grana der Chloroplasten. *Mikrochemie, Molisch-Festschrift* 447.
- 1937: Doppelbrechung der Chloroplasten. *Protoplasma* 27, 280.
- 1937: Assimilationsfähigkeit und Doppelbrechung der Chloroplasten. *Protoplasma* 27, 460.
- Zimmermann, A., 1890—1895: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, H. 1—3. Tübingen.

# The Microinjection of Adenosine Triphosphate into the Protoplasm of Skeletal Muscle Fibers

By

F. J. Wiercinski

Hahnemann Medical College, Department of Physiology, Philadelphia, Pa.

With 1 Figure

(Received January 18, 1956)

In recent years the role of adenosine triphosphate (ATP) in muscle contraction has drawn wide interest. Szent-Györgyi (1947, 1948, 1951 and 1953) and others have indicated that ATP plays an important role in the in-vitro reaction of purified muscle proteins.

At the present time, it is of importance to the physiologist to test the effect of ATP on the contractile property of the living muscle system.

This paper is a report of experiments carried out on portions of isolated muscle fibers of the frog. ATP solutions were microinjected into the muscle protoplasm and the effect on protoplasmic shortening was recorded.

## Materials and Methods

The adductor magnus muscle of *Rana pipiens* was isolated and placed in a dish of 0.12 M NaCl kept on ice at 5° C. to 8° C. The muscle fibers were dissected from the muscle with steel needles. Portions of single fibers approximately 1.5 to 2 mm. long were isolated and transferred by means of a dropper to a glass cover slip. Two portions of the same fiber were used for paired observations. Excess fluid was removed, the cover slip was inverted and placed over a moist chamber.

The fibers were inspected under the low power of the compound microscope. The length was measured with an ocular micrometer. Fresh fibers had a clear jelly-like appearance. Injured fibers were granular, and frequently had a brownish appearance. Such fibers were discarded.

A Chambers type micromanipulator was used (Chambers and Kopac 1950). Micropipettes were drawn with the Livingston machine



from Pyrex capillary tubing. Openings of 2 micra at the tip of the micro-pipette were found to be most satisfactory. The solution was injected into the center of the fiber radially and the sarcolemma was pierced by this procedure.

Solutions were prepared and then labeled as unknowns by another person so that the observer did not know the identity nor the composition of the solution that he was microinjecting. Chlorphenol red was used as a tracer so that the extent of an injection could be seen. This dye did not influence contraction when microinjected into muscle fibers. It was estimated that a 0.4% solution at pH 7.0 contained less than 0.1 M sodium ion.

The solution to be tested was injected until a trace of red dye was seen through the entire length of the fiber. The colorant permitted observation of the instant of fluid ejection from the pipette tip, its rate of flow and the region of injection into the muscle fiber (Wiercinski 1953). It was important that all the injected fluid should enter the fiber and not leak outside. Following the injection the fiber length was measured again. The amount of fluid injected was about 0.4% to 2.0% of the fiber volume.

Three preparations of ATP were used. These were obtained from Sigma, Rohm and Haas, and Bischoff. The di-barium ATP was converted into the sodium salt as follows: The powder was dissolved in hydrochloric acid, passed through Amberlite resin IR-120 HAG to remove heavy metals and barium salts. The resulting solution was then neutralized with NaOH. With the above procedure about one-half of the expected amount of ATP was obtained.

The ATP of these solutions was calculated on the basis of the acid-labile and total phosphorus which was determined by a modification of the Fiske-Subbarow (1925, 1927) method and by enzymatic assay. The sodium content of each sample was calculated on the basis of the amount of sodium hydroxide and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  that was added. All the solutions employed were at pH 7.0. In determining the sodium ion concentration the sodium ion content of all the components in the solutions was included.

## Results

The data are presented in Table 1 for the microinjection of 0.001 M ATP at various concentrations of sodium ion. The probability (P) that such a difference between means would be exceeded by chance was calculated according to Treloar (1935), using the relative deviate to enter the table or the graph for (P). The results indicate a significant shortening for 0.001 M ATP at 0.2 M and 0.3 M sodium ion concentrations. In these two instances the average % of shortening for the muscle fiber was 21 and 33%. For the controls at 0.2 and 0.3 M Na the average % of shortening was 4

and 9%. These are low values as compared with 11, 19 and 14% for the controls for 0.06, 0.1 and 0.4 M Na.

These suggest that a 0.001 M ATP free of barium ion, but perhaps, containing slight traces of heavy metals will cause a shortening of the muscle fiber of 13% over a sodium ion control. This value was obtained by averaging the means for 0.001 M ATP and the means for the various concentrations of sodium ion. The average shortening produced by distilled water was 10.5% (Heilbrunn and Wiercinski 1947).

Table 1. Shortening of frog muscle fiber following injection of 0.001 M ATP at various concentrations of Na, pH 7.0. (Resin) Ten fibers for each test.

Solution	Average % Shortening (mean)	Range	S. D.	Difference betw. Means (ATP + Na) — Na	P
0.001 M ATP + 0.06 M Na	25	5—35	13	14	0.01
0.06 M Na	11	4—22	9		
0.001 M ATP + 0.1 M Na	23	8—30	12	4	0.41
0.1 M Na	19	7—33	8		
0.001 M ATP + 0.2 M Na	21	12—28	8	17	0.01
0.2 M Na	4	1—11	3		
0.001 M ATP + 0.3 M Na	33	10—67	21	24	0.01
0.3 M Na	9	1—30	6		
0.001 M ATP + 0.4 M Na	18	1—56	6	4	0.318
0.3 M Na	14	4—29	8		

S. D. = standard deviation. P = probability that such a difference between the means would be exceeded by chance. Level of significance < 0.01.

In Table 2, a 0.003 M ATP at various sodium ion concentrations as compared with a 0.003 M ATP plus 0.05 M phosphate content at various sodium concentrations was microinjected. Barium ion and heavy metal ions were removed with resin. There was no significant difference between the means. The results indicate that phosphate ion inhibited ATP and no extension or relaxation of the fibers was observed.

In Table 3, a 0.05 M phosphate solution was microinjected with samples adjusted to various sodium ion concentrations. The inhibiting effect of increased sodium ion on shortening in the muscle fiber was significant.

Immersion of portions of isolated frog muscle fibers transferred from

0.12 M NaCl into varying concentrations of sodium ion and into 0.05 M phosphate ion plus varying concentrations NaCl caused a marked shortening. Microinjections which would allow an overflow of injectants into the sur-

Table 2. *Shortening and Extension of frog muscle fiber injected with 0.003 M ATP and 0.003 M ATP + 0.05 M phosphate at various Na concentrations. pH 7.0 (Resin). Ten fibers for each test.*

Solution	Mean	Range	S. D.	Difference betw. Means	P
0.003 M ATP + 0.14 M Na	19	5 to 47	12	17	0.016
0.003 M ATP + 0.14 M Na + 0.05 M PO <sub>4</sub>	2	- 12 to + 37	17		
0.003 M ATP + 0.2 M Na	23	10 to 45	17	9	0.228
0.003 M ATP + 0.2 M Na + 0.05 M PO <sub>4</sub>	14	- 6 to + 42	14		
0.003 M ATP + 0.3 M Na	1	- 20 to + 16	9	5	0.32
0.003 M ATP + 0.3 M Na + 0.05 M PO <sub>4</sub>	- 4	- 18 to + 12	12		
0.003 M ATP + 0.4 M Na	- 7	- 14 to + 11	11	11	0.160
0.003 M ATP + 0.4 M Na + 0.5 M PO <sub>4</sub>	+ 4	- 21 to + 33	20		

S. D. = standard deviation. P = probability that such a difference between the means would be exceeded by chance. Level of significance < 0.01.

Table 3. *Effect of injecting 0.05 M PO<sub>4</sub> at various Na concentrations into frog muscle fiber, pH 7.0.*

Solution	Mean	S. D.	Range
0.05 M PO <sub>4</sub> + 0.09 M Na	5	4	+ 1 to + 10
0.05 M PO <sub>4</sub> + 0.13 M Na	3	4	- 4 to + 8
0.05 M PO <sub>4</sub> + 0.18 M Na	1	8	- 9 to + 15
0.05 M PO <sub>4</sub> + 0.23 M Na	6	7	+ 1 to + 12
0.05 M PO <sub>4</sub> + 0.28 M Na	- 11	13	- 45 to 0
0.05 M PO <sub>4</sub> + 0.38 M Na	- 1	11	- 22 to + 13

rounding medium near the muscle fiber would influence the results especially in 0.3 M and 0.4 M concentrations. See Fig. 1.

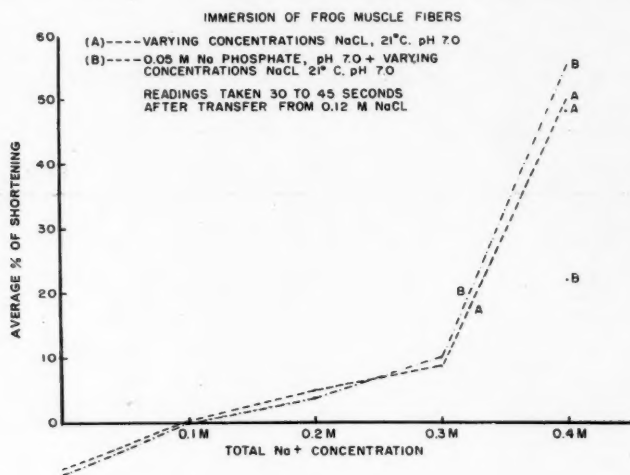


Fig. 1.

### Discussion

With the method used the results indicated that the microinjection of reasonable quantities of ATP into isolated muscle fibers produced about 13% of protoplasmic shortening as compared with the control fibers.

The literature shows that the immersion of muscle in ATP solutions does not stimulate the muscle to contract. Abdon (1942) applied ATP intra-arterially to the gastroneurium muscle of the frog and could not observe any stimulating action of ATP. Buchthal, Deutsch, and Knappeis (1944) and Buchthal and Falkow (1944) evoked tetanus-like contractions with ATP. ATP by itself did not produce any contraction of the rectus abdominis muscle of the frog (Babsky and Minajew 1946).

Szent-Györgyi (1950) included a personal communication from the work of Wiercinski and Cookson (1951) that a 1.0% ATP solution caused only a "weak contraction" when injected directly into the muscle fiber. Also, see Heilbrunn (1952), p. 442.

Beznak (1950) concluded that ATP had no direct effect on frog striated muscle. The contractions seen on the addition of ATP was due to the appearance of acetylcholine. Acierno, Burno, Burstein, and DiPalma (1952) found that ATP had no effect on refractory period, spontaneous rhythm, or contractility in the isolated atrial muscle of the cat unless previously altered by acetylcholine.

The work reported by Mommaerts (1954) and Fleckenstein, Janke, Davies, and Krebs (1954) indicated that a muscle can perform

work under certain conditions without the decomposition of an energetically equivalent amount of ATP or creatine phosphate.

Falk and Gerard (1954) confirmed the earlier findings on the intracellular injection of ATP in regard to the mechanical response of the sartorius muscle of the frog. They do not review the facts in the literature. Also, they injected 3M NaCl into the muscle fiber. Chambers and Resnikoff (1926) reported that high concentration of NaCl had an antagonizing action on protoplasm.

The trigger mechanism for contraction appears to be some other substance than ATP. Ranney (1954) indicated that uridine triphosphate and adenosine triphosphate are approximately equivalent in inducing contraction and relaxation of actomyosin in an in-vitro system. Also, Robb, Gruff, and Braunfelds (1955) reported that a variety of agents induced shortening of compressed threads of actomyosin.

Lepage and Potter (1949) showed the effect of trace impurities in ATP preparations. Cohen and Carter (1950) and Morell, Lipton, and Frieden (1951) discuss the problem of the separation and stability of ATP.

### Summary

1. The average shortening of frog muscle fiber produced by the microinjection of 0.001 M ATP, pH 7.0 as compared with a sodium ion control was about 13%.

2. The microinjection of 0.003 M ATP containing 0.5 M phosphate ion was insignificant in shortening muscle protoplasm at ranges of sodium ion from 0.1 to 0.4 M.

The author is grateful to Dr. Abel Lajtha of the Department of Pharmacology, New York State Psychiatric Institute for an analysis of the ATP preparations.

### Bibliography

- Abdon, N. O., 1942: Dissert. Lund, cit. Buchthal and Falkow (1944).
- Acierno, L., F. Burno, F. Burstein, and J. R. DiPalma, 1952: Actions of Adenosine Triphosphate on the Isolated Cat Atrium and their Antagonism by Acetylcholine. *J. Pharmacol. (Am.)* 104, 264-268.
- Babsky, E. B., and P. F. Minajev, 1946: Combined action upon muscle of Adenosine Triphosphatase, Acetylcholine, and Potassium, Calcium and Magnesium ions. *Nature* 158, 238.
- Beznak, A. B. L., 1950: ATP and ACH in the contraction of the striated frog muscle. XVIII. International Physiological Congress 103.
- Buchthal, F., A. Deutsch, and G. C. Knappeis, 1944: Release of Contraction and Changes in Birefringence Caused by Adenosine Triphosphate in Isolated Cross Striated Muscle Fibers. *Acta physiol. scand.* 8, 271-287.
- and B. Falkow, 1944: Close Arterial Injection of Adenosine Triphosphate and Inorganic Triphosphate into Frog Muscle. *Acta physiol. scand.* 8, 312-316.
- Chambers, R., and M. J. Kopac, 1950: Handbook of Microscopical Technique. C. E. McClung, editor. 3rd Edition, New York.

- Chambers, R., M. J. Kopac, and P. Resnikoff, 1926: The action of the chlorides of Na, K, Ca and Mg on the protoplasm of *Amoeba proteus*. J. gen. Physiol. (Am.) 8, 369—402.
- Cohn, W. E., and C. E. Carter, 1950: The separation of adenosine polyphosphates by ion exchange and paper chromatography. Amer. chem. Soc. 72, 4273.
- Falk, A., and R. W. Gerard, 1954: Effect of microinjected salts and ATP on the membrane potential and mechanical response of muscle. J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 43, 393—403.
- Fiske, C. H., and Y. Subbarow, 1925: The colorimetric determination of phosphorus. J. biol. Chem. (Am.) 66, 375—400.
- 1927: Nature of "inorganic phosphate" in voluntary muscle. Science 65, 401—403.
- Fleckenstein, A., J. Janke, R. E. Davies, and H. A. Krebs, 1954: Contraction of Muscle without fission of Adenosine Triphosphate or Creatine Phosphate. Nature 174, 1081—1085.
- Heilbrunn, L. V., and F. J. Wiercinski, 1947: The action of various cations on muscle protoplasm. J. of cellul. a. comp. Physiol. (Am.) 29, 15—32.
- 1952: An Outline of General Physiology, 3rd Edition. Philadelphia.
- LePage, G. A., and V. A. Potter, 1949: Effect of Trace Impurities in ATP. J. biol. Chem. (Am.) 179, 1229—1233.
- Mommaerts, W. F. H. M., 1954: Is Adenosine Triphosphate broken down during a single muscle twitch? Nature 174, 1083—1084.
- Morell, S. A., J. H. Lipton, and A. Frieden, 1951: Stability of Disodium Adenosine Triphosphate. Science 114, 333.
- Ranney, R. E., 1954: Dissociation and Contractile Reactions of Actomyosin with Uridine Triphosphate. Amer. J. Physiol. 178, 517—520.
- Robb, J. S., M. Grubb and H. Braunfelds, 1955: Shortening of Actomyosin Threads not induced by Adenosine Triphosphate. Amer. J. Physiol. 181, 39—42.
- Szent-Györgyi, A., 1947: Chemistry of Muscular Contraction, 1st Edition. New York.
- 1951: Chemistry of Muscular Contraction, 2nd Edition. New York.
- 1953: Chemical Physiology of Contraction, in Body and Heart Muscle. New York.
- Szent-Györgyi, A. G., 1950: Comparison of actomyosin formation in different muscle preparations. Enzymologia 14, 246—251.
- Treloar, A. E., 1935: An Outline of Biometric Analysis. Minneapolis, Burgess, 1935.
- Wiercinski, F. J., and B. A. Cookson, 1951: Experiments on the Microinjection of Adenosine Triphosphate into Skeletal Muscle Fibers. Fed. Proc. Part 1, 10, 146.
- 1953: Microinjection of solutions into the isolated muscle fiber of the frog. Fed. Proc. 12, No. 1, 155.

## Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen

### I. Die Wanderungsrichtung in der Kataphorese

Von

**Arnold Wartenberg**

Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität in Jena  
(Direktor: Prof. Dr. H. Wartenberg)

*(Eingegangen am 4. März 1956)*

Bei Struktur- und Stoffwechselforschungen an Pflanzen werden die „Azidität“ und das „Redoxpotential“ als selbstregulierte, als physiologische Zustandsgrößen beachtet. Im Gegensatz dazu wird die dritte, vielleicht ebenso variable und selbstregulierte Zustandsgröße ionen-, molekular- und kolloiddispers gemischter Lösungssysteme, nämlich das „Adsorptionspotential“, nur soweit in Betracht gezogen, wie die heterodispers-wässrige Lösung „Pflanze“ als Sorptionssystem zu beschreiben ist. In der histologischen Färbetechnik hat man es beim fixierten Material mit fixen Adsorptionscharakteren zu tun, und in der Vitalfärbetechnik der Zellphysiologie muß mit variablen und von der Zelle dynamisch regulierten Sorbentien und Sorptionsgrößen gerechnet werden. Die Forschung, welche mit variablen und von der Zelle dynamisch regulierten Sorbentien und Sorptionsgrößen als physiologische Merkmale der Zelle, also mit einem „physiologischen Adsorptionspotential“ rechnen wird, ist noch am Anfang der Entwicklung. Sie hat neben wenig klar zu durchschauenden und zu reproduzierenden Austauschreaktionen zunächst nur die isoelektrische Reaktion als die meßbare Größe, mit der man zu einer Vorstellung von Vorzeichen und Größenordnungen kommen kann.

Die wässrige Lösung „Pflanze“ ist keine einfache Eiweißlösung, sondern eine Lösung verschiedener Elektrolyte, Nichtelektrolyte und Kolloide sowohl lyophiler als auch lipophiler Natur. Man muß deshalb mit einem Gemisch rechnen, das neben ionen- und molekulardispersen Stoffen verschiedenartige Azidoide, Basisoide und Ampholyte enthält. Ist unter solcher Voraussetzung überhaupt noch von einem IEP der Zelle zu sprechen? Jedenfalls ist nicht zu erwarten, daß sich die Pflanzenzelle wie ein einfacher Ampholyt verhalten wird.

Stearn und Stearn (1931) kamen aus theoretischen Erwägungen über das Kolloidsystem „Zelle“ zu der gleichen Fragestellung. Sie ent-



wickelten die Vorstellung, daß in kolloiden Systemen mit mehr als einem Ampholyten der IEP jedes einzelnen durch geringere freie Ladung des Ganzen zum Ausdruck kommen muß und zeigten, daß dies bei Zellen der Fall ist.

Fritze (1952) verglich in Kataphoreseversuchen die wechselnde Oberflächenladung weißer Blutkörperchen, wie sie mit verschiedener  $\text{cH}^+$  des Milieus variierte, und einen im Kataphoreseversuch zum Ausdruck gekommenen IEP mit dem Verhalten von Ampholyten. Er beachtete dabei nicht den ganzen oder komplexen Ampholyten „Zelle“, sondern nur dessen „spezifische physiko-chemische Oberflächenstruktur“.

In der bekannten Kontroverse zwischen Kölbel (1947, 1948, 1949, 1952) und Drawert (1951, 1952) ging es letzten Endes auch um die Frage, was von seiten der Zelle das Bestimmende in ihrem kataphoretischen Verhalten sei. Drawert (1951) meinte, das Zytoplasma sei ein Eiweiß-Lipoid-Komplex und in elektrostatischer Hinsicht ein neutraler Körper. Die Carboxyl- und Aminogruppen, deren Dissoziationen den Ampholytcharakter der Plasmaeiweiße ausmachen, wären durch Lipide „abgeschirmt“. Kölbel stimmte der Drawertschen Ansicht zu, daß das Protoplasma ein elektroneutraler Körper sei, sagte aber, daß die Elektroneutralität nur als eine statistische Größe angesehen werden könnte. Der Plasma-Eiweiß-Komplex besitze dabei dennoch reaktionsfähige ionogene Gruppen, die zu Austauschreaktionen fähig wären. Die Drawertsche „Abschirmung“ muß demnach als Kolloidadsorption von empfindlicher Labilität angesehen werden. Es ist jedenfalls anzunehmen, daß der kolloiddisperse Grundkörper des Zytoplasmas — und müßte er als Eiweiß-Lipoid-Assoziation angesehen werden — auch im Dissoziationsspiel unter dem Zwang der reaktionsbestimmenden Elektrolyte und der Massenwirkung der Ionen steht. Hierbei ist die Eiweiß-Lipoid-Verbindung nur eine von vielen möglichen Assoziationen und kann nur soweit eine „Abschirmung“ nach Drawert darstellen, wie sie im Konkurrenzspiel der Affinitäten in Assoziation bleibt.

Der Kölbel-Drawertschen Kontroverse liegt folgender Sachverhalt zugrunde. Beide Autoren haben beschrieben, wie lebende Hefezellen in der ganzen Reihe der  $\text{cH}^+$  kataphoretisch immer anodisch wandern. Tote, durch Hitze abgetötete Hefezellen zeigen nach Kölbel (1949) einen IEP zwischen pH 2,6 und pH 2,9. Kölbel (1947) nannte unter anderen Bedingungen die Erscheinung  $\text{IEP}_M$ , d. h. er erklärte einen feststellbaren Wendepunkt des Charakters der kataphoretischen Wanderung in der Reihe der  $\text{cH}^+$  als einen Mittelwert unterschiedlicher, aber in einem relativ engen Gebiet gehäufte isoelektrischer Punkte verschiedener Ampholyte.

Kölbel will nun überzeugend bewiesen haben, daß die konsequente anodische Wanderung der lebenden Hefezellen auf einen Membraneffekt zurückzuführen sei. Die Membran der Hefezelle wäre kein amphoterer Körper, sondern ein Azidoid und beherrsche das kataphoretische Verhalten des Ganzen. Die Membran läßt sich mit basischen Farbstoffen anfärben. Dies hat nach Kölbel zur Folge, daß die Azidoidladungen durch die

Farbstoffkationen weitgehend neutralisiert werden und die Hefezellen sich kataphoretisch nach dem Ampholytcharakter des Protoplasten verhalten. Mit Hilfe solcher Neutralisierung der Membranladung hat Kölbl fest- gestellt, daß die toten Hefezellen einen  $IEP_M$  bei höherer  $cH^+$  haben als die lebenden.

Drawert (1951) arbeitete ebenfalls mit Hefezellen und berichtete wie Kölbl auch von einer konsequenten anodischen Wanderung der lebenden Hefe. Dann versuchte er das kataphoretische Verhalten der toten Hefe in einem größeren Schwankungsbereich der  $cH^+$  festzustellen und fand, daß die toten Hefezellen „bis etwa pH 4,5 zur Kathode und erst ab pH 5,0 zur Anode“ wanderten. Drawert fand also einen Wendebereich, der einem  $IEP_M$  entsprechen muß. Er zog daraus den Schluß, „daß durch den Absterbe- prozeß die Lipoproteide gesprengt werden, so daß jetzt die dissoziations- fähigen sauren und basischen Gruppen der Eiweißstoffe frei werden“. Dabei soll im sauren Medium durch die starke Dissoziation der basischen Gruppen die Ladung der Membran von den freien positiven Ladungen der Eiweißkörper übertönt werden und das Ganze kathodisch wandern müssen. Für das, was Kölbl Neutralisierung der Membranladung nannte, hatte Drawert eine andere Erklärung. Er versuchte das „Neutralisieren“ der Membran mit einer Anzahl verschiedener basischer Farbstoffe und erhielt Wendepunkte der kataphoretischen Wanderungsrichtung, die nach Kölbl nur vom  $IEP_M$  des Zytoplasmas bestimmt werden sollen, je nach der Disso- ziationskonstanten des verwendeten „neutralisierenden“ Farbstoffes bei verschiedenen Werten der  $cH^+$ . „Der nach Vitalfärbung mit stärker disso- ziierten basischen Farbstoffen an lebenden Zellen zu beobachtende elektro- phoretische Umschlagpunkt wird durch den Dissoziationsgrad des benutzen Farbstoffes und den physiologischen Zustand der Zellen bedingt. Er hat nichts mit dem  $IEP_M$  des lebenden Zytoplasmas zu tun.“

Aus der Kölbl-Drawert'schen Kontroverse ist zur Frage nach den Vorzeichen und den Größen der Sorptionsverhältnisse in der Hefezelle nur eine einzige übereinstimmende Antwort zu schöpfen. Die Zellmembran soll keinen Ampholyt-, sondern einen konsequenten Azidoidcharakter haben. Sie soll eine negative Ladung und sowohl im sauren als auch im alkalischen Medium die Tendenz zur anodischen Wanderung verursachen. Weniger übereinstimmend ist die Antwort auf die Frage nach dem Ladungscharakter und der Ladungsgröße des Zytoplasmas. Wenn auch die Zerstörung der Plasmastruktur, wie es Drawert meint, starke elektrostatische Ladungen frei werden läßt, die dann in ihren Wirkungen die Membranladung stark zu übertönen vermögen, so darf man wohl nicht eine absolute Elektro- neutralität des lebenden Plasmas als gegeben annehmen. Es ist durchaus möglich, daß die zum Leben befähigte Struktur des Plasmas gegenüber der zerstörten und zum Leben unfähigen Struktur eine im Vorzeichen andere Ladung hat. Es kann auch sein, daß sie bei gleichem Vorzeichen eine mindere Ladung hat, die bei der Zerstörung der euvitalen Struktur stärker wird, worauf Kölbl (1947) die Unterschiede der vitalen und letalen fluorochromatischen Reaktion nach Strugger (1944) zurückführt.

Eine Ladung und austauschfähige, d. h. dissoziierende Ionenadsorption muß aber auch im Plasma, das zum Leben fähig ist, gegeben sein, sonst hätte das Plasma keine variable Quellungsfähigkeit und die Pflanzenzellen könnten nicht die Austauschreaktionen, die physiologische Versauerung bzw. die physiologische Alkalisierung ihrer Medien, demonstrieren.

Aus der Kölbel-Drawert'schen Kontroverse ist dann aber auch ein Problem hervorgegangen, das zu klären für die Methodik der Bestimmung des Adsorptionspotentials sehr wichtig ist. Ob man es mit der Membranoladung oder mit den Ladungen des Plasmas pflanzlicher Zellen zu tun hat, in beiden Fällen nehmen die genannten Autoren an, daß die Richtung der kataphoretischen Wanderung den Ladungssinn von Adsorptionsflächen der betreffenden Zelle, d. h. den Ladungssinn des Adsorbens anzeigt. Im Gegensatz dazu ist es auch möglich, daß der Richtungssinn der kataphoretischen Wanderung durch den Ladungssinn der adsorbierten Ionen, also durch die Adsorbatladung bestimmt wird. In der nachfolgenden Abhandlung soll darüber ein Urteil gefällt werden, ob die Bewegungsrichtung der Zelle im Spannungsfeld der Kataphoreseapparatur durch die Eigenladung der Ampholytionen oder durch die an diesen Ladungen adsorbierten Ionen, ob die Richtung der Bewegung also durch die Adsorbensladung oder durch die Ladungen des Adsorbates verursacht wird.

Weiter wird zu untersuchen sein, inwieweit die Lage eines feststellbaren Wendepunktes der kataphoretischen Wanderungsrichtung durch den Einfluß verschiedener Charaktere von Kationen und Anionen der Laugen, Säuren und Salze des Suspensionsmittels mitbestimmt wird. Wenn nämlich die Richtung der kataphoretischen Wanderung durch die Adsorbatladungen mitbestimmt wird, dann muß angenommen werden, daß durch die verschiedenen Dissoziationskonstanten der jeweiligen Bindungen unterschiedliche Wendepunkte der kataphoretischen Wanderungsrichtung auftreten. In solchem Falle könnte dann nicht von einem IEP oder einem IEP<sub>M</sub> im Sinne Kölbel's gesprochen werden, denn der IEP muß in jedem Falle unabhängig von der Art und der Konzentration der Säureanionen und Basenkationen der die  $\text{cH}^+$  regulierenden Pufferlösungen sein (vgl. Michaelis und Davidsohn 1910).

### Fragen der Methode und des Materials

Für die Versuche ist eine Mikrokataphoreseapparatur verwandt worden, die auf einem Mikroskop aufgeschraubt werden konnte. Elektrodenhalter und Stromzuführungen waren auf der Apparatur, also auch auf dem Mikroskop fest angebracht, wodurch eine optimale Arbeitssicherheit erreicht werden konnte. Als Kataphoresekommer diente ein Objektträger, auf dem vier längere Deckglasstücke so aufgeklebt waren, daß ein länglicher Trog von  $8 \times 40$  mm entstand. Die Kammer war nach oben durch ein Deckglas von  $16 \times 24$  mm abgeschlossen, das von der Kammerflüssigkeit berührt und benetzt wurde. An den vom Deckglas nicht bedeckten Enden der Kammer tauchten die Elektroden in die Flüssigkeit ein. Die Flüssigkeitselektroden waren, wie Drawert (1951) empfohlen hat, so angebracht,

daß der Kontakt zwischen den Elektroden und der Kammerflüssigkeit nur durch die Kohäsion der Pufferlösung aufrechterhalten wurde; die Kataphoresekammer konnte dadurch frei unter den Elektroden hinweggezogen werden, wodurch ein schnelles Wechseln der Kammer möglich war.

Als Elektroden wurden „nicht polarisierbare“ 0,1 molare KCl-Agarelektroden nach Gicklhorn und Umrath (1928) verwandt. Ihre Fassungen waren gebogene Glasrohre von 8 mm innerem Durchmesser, die an dem Ende, das den Strom in die Kataphoresekammer einführte, zu Kapillaren von 1 bis 1½ mm Stärke ausgezogen worden waren. Schwankungen des Elektrodendurchmessers innerhalb dieser Grenzen hatten auf den inneren Widerstand der Elektroden keinen nennenswerten Einfluß. Es wurde aber trotzdem bei den zu vergleichenden Versuchen stets dasselbe Elektrodenpaar benutzt, so daß sich mögliche Fehler kompensierten. Die Stromzuleitung zu den Flüssigkeits Elektroden geschah mit 0,1 mm starkem Platindraht, der nach den Angaben von Kölbl (1947) als Spirale in den Elektrodenagar eingeführt wurde. Im Laufe der Untersuchungen hat sich jedoch herausgestellt, daß es praktischer ist, die Platinspirale nur bis in die 0,1 mol KCl-Lösung zu führen, die über dem Agar steht, weil dann die Gase, die beim Stromdurchfluß elektrolytisch entstehen, besser abgeleitet werden.

Als Stromquelle stand eine Anodenbatterie von 120 Volt Spannung zur Verfügung. Mit einem Potentiometer von 50 k $\Omega$  konnte die Stromstärke für die laufenden Versuche auf 1,5 mA eingestellt werden. Die Schwankungen der Stromstärke waren in keinem Fall größer als  $\pm 3\%$ .

Als Puffer benutzte ich zunächst einen Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer, der einen Bereich der  $\text{cH}^+$  von pH 2,2 bis pH 8,0 umfaßte. Als weitere Pufferlösungen kamen ein Essigsäure-Natriumazetat-Puffer, ein Natriumphosphatpuffer (prim. und sek. Phosphat), ein Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer und ein Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer zur Verwendung. Sämtliche Pufferlösungen sind in 0,1 molarer Konzentration angesetzt worden. Die genaue  $\text{cH}^+$  der einzelnen Pufferlösungen ist mit der Chinhydronelektrode unter Verwendung des Ionometers nach Lautenschläger gemessen worden. Die Genauigkeit der Messung betrug 0,01 Zehnerpotenz der  $\text{cH}^+$ .

Für den Hauptteil der Versuche nahm ich frische Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Die Lebendkontrolle geschah einmal durch Fluorochromierung mit Acridinorange (Strugger 1944), zum andern durch Bestimmen der Wanderungsrichtung im Kataphoreseversuch. Bei relativ hoher  $\text{cH}^+$  (pH 2,0 bis pH 2,4) bewegten sich lebende Hefezellen in einem 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer zur Kathode, während tote anodisch wanderten. Die lebende Hefe ist für die Untersuchungen in der 100fachen Menge der jeweiligen Pufferlösung suspendiert worden. Tote Hefe, wie sie für die Vergleichsuntersuchungen benötigt wurde, ist in folgender Weise hergestellt worden: Ich schwemmte etwa ein Gramm Preßhefe in der fünffachen Menge Benedeklösung auf. Die Suspension erwärmte ich im Wasserbad auf 100° C, ohne daß die Hefesuspension dabei zum Kochen kam und hielt sie dann noch drei Minuten bei dieser Temperatur. Darauf ließ ich

sie unter fließendem Wasser in 30 Sekunden auf Zimmertemperatur abkühlen. Zum Vergleich wurde eine Hefesuspension nach dem Erwärmen und Halten im Wasserbad bei 100°C über direkter Flamme sprudelnd gekocht und dann wie üblich behandelt. Diese Aufschwemmungen von toter Hefe sind für die Versuche mit der 20- bis 40fachen Menge von Pufferlösung gemischt worden.

### Ergebnisse der Versuche

Die lebenden Hefezellen sollen nach Kölbel (1947) und nach Drawert (1951) summarisch den Charakter eines Säureanions haben. Eigene Versuche konnten dies bestätigen. Die lebende Hefe nimmt in schwach sauren Bereichen der  $\text{cH}^+$  des Dispersionsmittels überwiegend Kationen im Austausch gegen Wasserstoffionen auf.

Fünf Gramm Presshefe suspendierte ich in 50 ml 0,1 mol KCl-Lösung, die eine  $\text{cH}^+$  von pH 5,75 hatte. Nach 30 Minuten zentrifugierte ich die Hefe von der Lösung ab und maß erneut die  $\text{cH}^+$  der Lösung, die nun bei pH 4,97 lag. Es war eine Versauerung der KCl-Lösung eingetreten, die nur so zu erklären ist, daß die Wasserstoffionen von der Hefe im Austausch gegen Kaliumionen geliefert worden sind, was andererseits nur dann möglich ist, wenn die Zellampholyte in der Gesamtheit summarisch anionisch geladen sind.

Im Gegensatz zu Kölbel und Drawert wanderten in meinen Kataphoreseversuchen die lebenden Hefezellen aber nicht zur Anode, sondern in Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern im Bereich der  $\text{cH}^+$  zwischen pH 2,5 und pH 8,0 immer zur Kathode (vgl. Tab. 1, Pos. 3). Man ist somit zu der Annahme gezwungen, daß die Hefezellen im Spannungsfeld nicht nach der akuten anionischen Eigenladung ihrer ampholytischen Kolloide, sondern mit der Ladung der adsorbierten und dissoziierenden Ionen (Kationen) wandern.

Zunächst mußte festzustellen versucht werden, wie es kommen konnte, daß Kölbel und Drawert die anodische Wanderung der lebenden Hefezellen zu beobachten vermeinten. Der Unterschied zwischen den Kölbel'schen und Drawert'schen Beobachtungen einerseits und meinen Beobachtungen andererseits ist nicht etwa auf einen anderen physiologischen Zustand der Hefe meiner Versuche zurückzuführen. Kölbel und Drawert mußten sich geirrt haben, als sie die Strömungserscheinungen beurteilten, die in der Kataphoresekammer auftraten.

Bei der Beurteilung der Verhältnisse in der Kataphoresekammer hat man zunächst daran zu denken, daß eine Wanderung der Elektrolytionen im Spannungsfeld stattfinden muß, was bei ungleicher Hydratation der Ionen eines Elektrolyten eine elektroosmotische Verlagerung von Wasser zur Folge hat und daß die Zellen vielleicht in dieser Wasserbewegung passiv mitgeschleppt werden können oder ihre Eigenbewegung im Spannungsfeld gegen oder mit dieser Wasserbewegung ausführen müssen. Hat man anzunehmen, daß die Wanderung der Hefezelle nicht passiv im elektroosmotischen Strom, sondern aktiv in eigener Kataphorese geschieht, dann

ist zu bedenken, daß die kataphoretische Bewegung der Zelle ebenfalls eine elektroosmotische Wasserbewegung verursacht. Würde man, wie Kölbl (1947) es tat, mit der Kataphoresekammer wie mit einer Kapillare rechnen, dann wären nach der Formel von Smoluchowski (1921)

$$D = d \left( \frac{1}{2} \pm \sqrt{\frac{1}{12}} \right)$$

( $D$  ist die Höhe der Kammer, in der sich bei Annäherung an die Grenzfläche Lösungsmittel — Glaswand die elektroosmotisch verursachte Bewegung des Lösungsmittels dem Wert Null nähert, während  $d$  die Gesamthöhe der Kammer ist) weder in der bodennahen noch in der deckelnahen Lösungsschicht nennenswerte elektroosmotische Wasserbewegungen zu erwarten. Das Lösungsmittel wird dort unter der Gewalt der Adhäsion festgehalten.

Die Formel ist für elektroosmotische Wasserbewegungen in Kapillaren, in denen keine Gegenströmung herrscht, zutreffend. Die Kataphoresekammer ist aber keine Kapillare ohne Gegenströmung. Wenn in der Kataphoresekammer Wassermassen elektroosmotisch bewegt werden, dann muß unter hydrostatischem Zwang eine Gegenströmung zustande kommen, die in der bodennahen und in der deckelnahen Lösungsschicht ebenso durch den Zwang der Adhäsion gehindert wird wie die elektroosmotische Bewegung nach Smoluchowski. Die Zirkulationsbewegung einer Elektrolytlösung in einer Kataphoresekammer ist also nicht so einfach anzunehmen, wie sie von Kölbl dargestellt wurde, der in den mittleren Kammerschichten eine Elektroosmose und in der Boden- und Deckelnähe Rückströmungen erwartete. Sofern man es nicht mit einer elektroosmotisch bedingten Strömungsrichtung in einer beiderseits offenen Kapillare, sondern mit einer elektroosmotisch und hydrostatisch bedingten Zirkulationsbewegung in einem Raum zu tun hat, ist der Sachverhalt komplizierter. Man muß dann mit drei Bewegungstendenzen rechnen: 1. mit der elektroosmotischen Strömung, 2. mit der Bewegung Null im Bereich der Grenzflächenadhäsion und 3. mit einer Gegenströmung im Bereich des geringsten Widerstandes, dessen Lage nicht leicht zu berechnen ist. Die Lage eines Bereiches des geringsten Widerstandes ist von einer großen Anzahl unbekannt variabler Faktoren abhängig, die in der oben genannten Formel nicht berücksichtigt sind. Die Probleme unserer Kataphoresekammer berühren diese Dinge aber erst in zweiter Linie. Es ist zunächst etwas anderes zu beachten, was die Zirkulationsbewegung in der Kataphoresekammer beherrscht.

Der Inhalt unserer Kataphoresekammer ist keine reine Elektrolytlösung, deren Träger nur unter dem Zwang der Lösungstension und der Oberflächenaktivität konstant verteilt sind. Unsere Hefeaufschlemmung in der Kataphoresekammer ist eine kolloide Suspension, deren Teilchen durch Ionenadsorption Ladungsträger mit großer Ladungsdichte, also starke Ladungsträger sind und infolge ihrer Sedimentation eine ungleiche und inkonstante Verteilung der Ladungsträger bewirken. Diese Tatsachen lassen ganz andere Verhältnisse erwarten, als sie für eine Elektrolytlösung in einer Kapillare anzunehmen sind.



Ist das suspendierte Zellmaterial in der Kataphoresekammer gleichmäßig verteilt, dann wandern die Zellen im Spannungsfeld in der Richtung, die durch die elektrostatischen Ladungen der an die Zellampholyte adsorbierten und dort dissoziierenden Ionen bestimmt wird. Die Zellen bewegen dabei nicht nur ihr eigenes Volumen, sondern auch erhebliche Flüssigkeitsmengen in Form des Hydratationswassers nach dem einen Ende der Kataphoresekammer, und das dort verdrängte Wasser muß auf Grund des hydrostatischen Überdruckes, der sich maximal nach unten auswirkt, vornehmlich am Kammerboden eine Rückströmung verursachen. Der Rückstrom erfährt dort eine Hemmung durch die Adhäsion des Lösungsmittels an der Grenzfläche. Es muß daher mit einer maximalen Rückstrombewegung in einer gewissen Entfernung von der Grenzfläche gerechnet werden. Die Zellen, die sich am Boden der Kammer oder in unmittelbarer Nähe desselben befinden, bewegen sich dann in der zur eigentlichen kataphoretischen Wanderung entgegengesetzten Richtung, sie werden vom Rückstrom mitgenommen. Es kann auch sein, daß in der bodennahen Lösungsschicht sich die Zellen im Spannungsfeld gar nicht zu bewegen scheinen, daß sie scheinbar stillstehen. Sie bewegen sich dabei aber ebenso wie die Zellen in höheren Lösungsschichten, werden jedoch von der entgegengerichteten Bewegung des Lösungsmittels in entgegengesetzter Richtung verschleppt. Wenn sie stillzustehen scheinen, dann haben ihre kataphoretische Wanderung und die entgegengerichtete Rückströmung gleiche Geschwindigkeiten, so daß die Zellen für den Beobachter ruhen. Man kann dies leicht nachweisen, indem man während der Beobachtung den Strom ausschaltet. Der Bewegungsimpuls der Kataphorese setzt dann aus, das Verschlepptwerden durch die Rückströmung hält aber noch kurze Zeit an, wobei die scheinbare Wanderung verstärkt wird oder die scheinbar unbewegten Hefezellen sich in der Richtung des Rückstromes zu bewegen beginnen.

Kölbel nahm dagegen an, daß sich der Rückstromeffekt sowohl am Kammergrunde als auch an der oberen Begrenzung der Kammer auswirke. Dies kann jedoch nicht sein, weil sich der hydrostatische Druck, wie schon erwähnt wurde, unter diesen Bedingungen nach unten auswirken muß. Kölbel und auch Drawert haben eine entgegengesetzte Wanderung der Hefezellen an der oberen Grenzfläche der Kammer, soweit die Veröffentlichungen darüber Aufschluß geben, nie beobachtet, und auch in meinen Versuchen trat sie niemals auf.

Die elektroosmotische Strömung und die Rückströmung des Lösungsmittels in der Kataphoresekammer mußten nicht nur eingehend untersucht werden, weil der Gegensatz der Kölbel-Drawertschen Berichte zu meinen Befunden aufzuklären war. Was in der Kataphoresekammer vorgeht, muß unter allen Umständen für die Urteilsbildung eindeutig zu erkennen und zu verstehen sein. Es ist dies eine zentrale und alles entscheidende Forderung der methodischen Grundlagen der Untersuchungen.

Wie sich das Sachverhalten aufklärte, wird in den folgenden Zeilen kurz dargestellt: Bei der Hefe hat man es mit Zellen zu tun, die in der Kataphoresekammer sehr rasch sedimentieren. Man hat im Versuch also



nicht nur eine horizontale, sondern auch eine vertikale Bewegung der Zellen zu beachten. In meinen Versuchen hatte die Kammer eine Höhe von 0,2 bis 0,3 mm. Innerhalb  $\frac{1}{2}$  bis 1 Minute nach Versuchsbeginn sammelten sich etwa 95% der Zellen auf dem Boden an, und nach 2 bis 3 Minuten waren im oberen Kammerraum meist überhaupt keine Zellen mehr zu finden. Um den von Kölbel beschriebenen Effekt, daß die Hefezellen beim Kataphoreseversuch in der Kammermitte im Spannungsfeld entsprechend ihrem Ladungssinn und am Kammergrund mit der Rückströmung des Lösungsmittels entgegengesetzt wandern, beobachten zu können, mußte ich spätestens 5 Sekunden nach dem Einbringen der Hefesuspension in die Kataphoresekammer die Spannung anlegen und die Wanderungsrichtung ermitteln. Während weiterer 15 bis 30 Sekunden änderten sich die Verhältnisse nämlich grundlegend. Die auf dem Kammerboden je nach der ursprünglichen Suspensionsdichte inzwischen mehr oder weniger dicht angesammelten Hefezellen wanderten nun eindeutig in Richtung ihres elektrostatischen Ladungssinnes, bei negativer Adsorbatladung also zur Anode, bei positiver zur Kathode. Wie ist dies zu erklären?

Je mehr Hefezellen sich am Kammerboden angesammelt haben, um so mehr adsorbierte Ionen sind dort relativ eng versammelt und um so größere Anteile des Lösungsmittelvolumens dieser Schicht stellen die Hydrationshüllen der im Spannungsfeld wandernden dispergierten Teilchen. Was am Anfang des Versuches der hydrostatische Druck an der Elektrode vermochte, nämlich im unteren Teil der Kammer einen Rückstrom zu erzwingen, ist jetzt nicht mehr möglich, denn es stehen jetzt im unteren Teil der Kammer eine vielfach größere Anzahl Ladungseinheiten und hierdurch größere Volumenteile des Lösungsmittels in dem Bewegungsimpuls, der vom Spannungsfeld ausgeht.

Die Stärke des elektroosmotischen Stromes ist ja nicht nur von der angelegten Spannung abhängig, sondern steigt auch bei konstanter Spannung mit der Ladungsdichte im Lösungsmittel. In einer Elektrolytlösung bewirkt die Lösungstension eine gleichmäßige Ladungsdichte, die nur durch die Oberflächenaktivität des Gelösten differenziert wird. Soweit durch die Oberflächenaktivität eine Verdichtung der Ladung an festen, unbeweglichen Grenzflächen zustande kommt, kann sich diese nicht stromverstärkend auswirken. Es ist dort die Hemmung gegeben, die an Hand der Smoluchowskischen Formel besprochen wurde. Anders ist es, wenn suspendierte Hefezellen auch Grenzflächen darstellen, und das tun sie sinngemäß, weil sie starke Adsorbentien sind. Sie verdichten die elektrostatischen Ladungen der Lösungen schon an sich, und wenn sie sedimentieren, dann hat dies eine einseitige Ladungsverdichtung im Lösungsraum zur Folge, die bei gleichbleibend angelegter Spannung eine erhöhte Stärke des elektroosmotischen Stromes dort erwirken muß, wo die Verdichtung gegeben ist.

Bewirkte in unserer Kataphoresekammer vorher der vom Spannungsfeld herrührende Bewegungsimpuls einen elektroosmotischen Strom in den oberen Lösungsschichten und der vom hydrostatischen Druck herrührende Bewegungsimpuls einen Rückstrom in den unteren Lösungsschichten, dann

müssen mit zunehmendem Sedimentieren der Hefezellen und mit dem damit verbundenen Verdichten der Ladungsträger in den unteren Lösungsschichten größere Massen Wasser gegen die Wirkung des hydrostatischen Druckes bewegt werden. Es muß deshalb bei einem gewissen Grad des Sedimentierens zum Stillstand und dann zur Umkehr der Strömungsbewegung kommen, die in den oberen Schichten des Kammerraumes elektroosmotisch und in den unteren Schichten in entgegengesetzter Richtung durch den hydrostatischen Druck bedingt war. In den bodennahen Schichten des Kammerraumes wird dann die wirkliche kataphoretische Wanderung der Zellen mit der elektroosmotischen Strömung und in den höheren Schichten die Rückströmung der verdrängten Wassermengen und ein passives Rückwärtsbewegtwerden der dort noch vorhandenen wenigen Hefezellen stattfinden.

Die Umkehr der Zirkulationsströmung im Kammerraum ist nicht nur vom Mengenverhältnis der in den oberen und unteren Schichten des Kammerraumes suspendierten Zellen abhängig. Bevor das Sedimentieren der Zellen sich auswirkt, ist die durchschnittliche absolute Suspensionsdichte in besonderer Funktion mitbestimmend. Bei sehr geringer Suspensionsdichte (25 mg Hefe im Liter Lösungsmittel) wandern die Hefezellen in allen Schichten der Kataphoresekammer im Spannungsfeld auf Grund ihrer Ladung. Die Wirkung eines hydrostatisch bedingten Rückstromes macht sich nicht bemerkbar. Bei etwas größerer Suspensionsdichte beginnt der hydrostatisch bedingte Rückstrom in den bodennahen Schichten. Bei noch größerer Suspensionsdichte (1 bis 10 g Hefe im Liter Lösungsmittel) kann man kaum genügend schnell arbeiten, um eine Beobachtung zu erzielen, bei der das Sedimentieren noch keine Rolle spielt. Es ist dann leicht möglich, daß man Verhältnisse erfaßt, bei denen ein bodennaher Rückstrom des Dispersionsmittels und die kataphoretische Wanderung der bodennahen Hefezellen gleiche Geschwindigkeiten haben, was, wie schon gesagt wurde, dem Beobachter einen Ruhezustand, ein Nichtwandern vortäuscht, von dem er vielleicht irrtümlich auf einen IEP schließt. Ist das Sedimentieren etwas weiter fortgeschritten, dann wandern die Hefezellen in den bodennahen Schichten kataphoretisch entsprechend ihrer Ladung und bewegen elektroosmotisch Wassermengen, die einen hydrostatischen Rückstrom in den höheren Schichten finden müssen, wo dann auch ein Stillstand der Wanderung vorgetäuscht werden kann, wenn die kataphoretische Wanderung der Hefezellen und der Rückstrom des Dispersionsmittels gleiche Geschwindigkeiten haben. Der solcherweise scheinbare Ruhezustand kann, wie schon oben gesagt wurde, leicht als Gleichgewichtslage der kataphoretischen Wanderung und des antipaten, hydrostatisch bedingten Rückstroms nachgewiesen werden, weil nach dem Abschalten der Spannung nur der kataphoretische Impuls sofort aussetzt und der entgegengerichtete Impuls etwas nachhaltig wirkt, also die scheinbar ruhenden Zellen dann plötzlich mit dem Rückstrom bewegt werden.

Bisher war noch nicht die Frage gestellt worden, welchen Einfluß die nichtadsorbierten freien Elektrolyte auf die Erscheinungen der kataphore-

tischen Wanderung haben. Auch sie wandern im Spannungsfeld und können nach dem Unterschied der Hydratation ihrer Kationen und ihrer entgegengerichtet wandernden Anionen eine elektroosmotische Bewegung des Lösungsmittels nach der Kathode oder nach der Anode und dementsprechend einen hydrostatisch bedingten Rückstrom verursachen, wobei vielleicht suspendierte Zellen passiv verschleppt werden, insbesondere dann passiv verschleppt werden, wenn sie selbst nur gering elektrostatisch geladen sind. Wir haben es aber, wie in dieser Abhandlung gezeigt wird, bei den Hefezellen mit Körpern zu tun, die variabel Verdichtungen der Ladungsträger im Lösungsraum bewirken. Bei den  $\text{cH}^+$  und den Konzentrationen der Elektrolyte der Versuchsanordnung zur Frage nach der Wanderungsrichtung ist immer mit relativ starken Ladungen der suspendierten Zellen zu rechnen. Wo sie sich im Ladungsraum schichtweise sammeln, müssen notwendig Lösungsschichten mit großer Ladungsdichte zustande kommen, in denen die kataphoretische Wanderung einen starken elektroosmotischen Strom bewirkt. Diese Schichten beherrschen dann alle Bewegungen im Lösungsraum. Der hydrostatisch verursachte Rückstrom muß sich den Weg des geringsten Widerstandes suchen und kann nie in den Lösungsschichten fließen, in denen die Ansammlung der Zellen erfolgt, wenn diese stärkere Ladungen haben.

Es ist nun die Frage zu beantworten, wie und wann in der Versuchsanordnung der Richtungssinn der kataphoretischen Wanderung von Hefezellen mit Sicherheit zu beurteilen ist. Nach den Umständen, die oben dargelegt wurden, gibt es nur eine Situation in der Kataphoresekammer, die ein eindeutiges Urteil erlaubt. Es muß die Suspension der Hefezellen so weit verdünnt werden, daß bei nahezu vollständiger Sedimentierung in bodennahen Schichten zwar mit einer möglichst großen Verdichtung der Ladungsträger zu rechnen ist, aber auch noch die Bewegung einzelner Zellen mikroskopisch verfolgt werden kann. Zur Kontrolle, daß die festgestellte Bewegung kein passives Mitgenommenwerden in einem Rückstrom ist, muß beobachtet werden, ob die Bewegung nach dem Abschalten der Spannung sofort aufhört oder ob sie noch eine Weile weitergeht oder gar beschleunigt wird. Geht sie mit nicht plötzlich verminderter Geschwindigkeit weiter, dann handelt es sich um ein rein passives Mitgenommenwerden, was bei nichtgeladenen Zellen möglich ist. Hört die Bewegung plötzlich auf oder wird die Geschwindigkeit der Bewegung plötzlich vermindert, ohne daß sie ganz aufhört, dann war die Bewegung kataphoretisch. Tritt in Erscheinung, daß bei beobachteter geringer Bewegung nach dem Abschalten der Spannung die Bewegung beschleunigt wird, dann war es eine gegen einen stärkeren Rückstrom gerichtete kataphoretische Bewegung.

Wird die Kontrolle nicht vernachlässigt, dann hat die Methode, eine kataphoretische Wanderung der Hefezellen nach dem Sedimentieren zu beobachten, ausreichende Sicherheit für ein eindeutiges Urteil über den Richtungssinn der Wanderung. Es kommt übrigens dann nie vor, daß die sedimentierten bodennahen Zellen nach dem Ausschalten der Spannung nicht sofort stillstehen. Nur bei den noch in höheren Lösungsschichten schweben-

den einzelnen Nachzüglern des Sedimentierens, die sich gegen einen stärkeren Rückstrom bewegt haben, vermerkt man eine Beschleunigung oder eine Umkehr in den Richtungssinn des Rückstroms.

Nach der oben beschriebenen Analyse der Vorgänge in der Kataphoresekammer war es klar, daß nur die Wanderung der Hefe nach dem Sedimentieren, d. h. nach dem Ansammeln einer relativ großen Ladungsdichte über dem Boden der Kammer und einer weitgehenden Verminderung der Ladungsdichte im übrigen Kammerraum, ein eindeutiges Urteil über die Wanderungsrichtung zuläßt.

Wie oben auch besprochen wurde, ist am Kammerboden im Bereich der größten Adhäsion mit einer Hemmung der Wanderung zu rechnen. Die Hemmung ist bei der Wanderung der Hefezellen auch tatsächlich zu vermerken. Sie wirkt sich aber nur an der Seite der Hefezelle aus, die dem Boden aufliegt oder, besser gesagt, zugekehrt ist. Sie könnte den Boden nur dann unmittelbar berühren, wenn sie stärker als die den Boden benetzende Flüssigkeit an ihm haften würde, und sie wäre dann wahrscheinlich unbeweglich. Man muß annehmen, daß die Hefezelle nur mit ihrer dem Boden zugekehrten Seite in den stärkst wirkenden Adhäsionsbereich, d. h. in den Bereich einer relativ starken Minderung der Beweglichkeit kommt und zumindest auf dieser Seite eine stärkere Hemmung erfährt als auf der dem Boden abgewandten Seite. Nach dem Sedimentieren ist nämlich ihre Bewegung kein Gleiten, sondern ein Rollen, d. h. sie folgt dann an der Oberseite leichter dem Zug im Spannungsfeld als an der Unterseite.

Es werden hier in der Abhandlung kataphoretische Wanderungen von Zellen bei Anwendung verschiedener Suspensionsmittel verglichen. Es ist dabei nicht anzunehmen, daß der durch die Adhäsion in der Bodennähe gegebene Widerstand in allen Lösungen gleich ist. Es ist vielmehr mit Unterschieden zu rechnen, die als Fehler unvermeidbar sind und nicht berücksichtigt werden können, weil ihre Größen unbekannt bleiben. Der Unterschied der Ladungsstärke und des Ladungssinnes, der durch das Variieren der Lösungsmittel sich ergibt, ist aber so bedeutend, daß mögliche Unterschiede in der Adhäsionswirkung unberücksichtigt bleiben können.

Unter Beachtung aller dieser Umstände muß geurteilt werden, daß in meinen Kataphoreseversuchen Hefezellen nach dem Sedimentieren einer ausreichend dichten, aber für die Beobachtungsmöglichkeit auch hinreichend verdünnten Suspension in 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern eindeutig zur Kathode wanderten (vgl. Tab. 1).

Kölbel (1947) arbeitete bei seinen Kataphoreseversuchen mit Zellsuspensionen von etwa 3 g Preßhefe pro Liter und beobachtete die Wanderung der Zellen im Kammerraum, die nach seinen Angaben zur Anode wanderten, was Drawert (1951) bestätigte. Auf dem Kammergrund wanderten die Hefezellen aber sowohl bei Kölbel als auch bei Drawert zur Kathode. Die Wanderungsrichtung der lebenden Hefe war also bei beiden Autoren ebenso wie in meinen Versuchen, wenn ich 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer verwandte, kathodisch, da die Wanderung

der Zellen auf dem Kammergrunde in der eigentlichen kataphoretischen Wanderungsrichtung erfolgt.

Weitere Versuche zeigten, daß die konsequente kathodische Wanderung lebender Hefe nur bei Anwendung des Zitronensäure-Natrium-

Tab. 1. *Kataphoretische Wanderungsrichtung lebender Hefezellen bei abgestuften Werten der  $\text{cH}^+$  verschiedener Pufferlösungen.* (K = kathodische Wanderung, A = anodische Wanderung.)

	I	II	III	IV	V
pH 2,50			K	K(A)	K A
pH 2,70			K	(K)A	(K)A
pH 2,90			K	K	A
pH 3,06			K	K	K A
pH 3,27			K	K	K(A)
pH 3,42			K	K	(K)A
pH 3,58			K	K	K A
pH 3,75			K	K	K(A)
pH 3,91			K	K	K A
pH 4,13			K	K	K
pH 4,33			K	K	K(A)
pH 4,53			K	K	K
pH 4,70			K	K	K
pH 4,93	K		K	K	K
pH 5,15	K		K	K	
pH 5,37	K		K	K	
pH 5,50	K		K	K	
pH 5,75	K	K	K	K	
pH 5,90	K	K	K	K	
pH 6,10	K	K	K	K	
pH 6,35	K	K	K	K	
pH 6,52	K	K	K		
pH 6,71		K	K		
pH 6,85		K	K		
pH 7,00		K	K		
pH 7,22		K	K		
pH 7,50			K		
pH 7,76			K		
pH 8,00			K		

I = 0,1 mol Essigsäure-Natriumazetat-Puffer.

II = 0,1 mol Natriumphosphatpuffer.

III = 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer.

IV = 0,1 mol Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer.

V = 0,1 mol Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer.

phosphat-Puffers bzw. eines reinen Phosphat- oder Essigsäure-Natriumazetat-Puffers zu beobachten war (vgl. Tab. 1). Nimmt man für die Kataphoreseversuche einen Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer gleicher Konzentration, so wandert die lebende Hefe zwischen pH 2,90 und pH 6,35 zur Kathode, bei pH 2,70 und pH 2,50 aber auch teilweise zur Anode. Noch

stärker war die Erscheinung des abweichenden Verhaltens bei der katarphoretischen Wanderung der lebenden Hefe in einem 0,1 mol Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer ausgeprägt, in dem erst bei geringerer  $\text{cH}^+$  als pH 4,33 eine rein kathodische Wanderung beobachtet werden konnte, während zwischen pH 2,50 und pH 4,33 die Wanderung wechselnd einmal stärker anodisch, ein anderes Mal wieder stärker kathodisch war (vgl. Tab. 1).

Es mußte zunächst damit gerechnet werden, daß die Puffergemische auf die Hefe toxisch wirkten, was zum Absterben der Zellen führen konnte, wodurch die Ladungen der Hefezellen, wie schon Kölbel (1947) und Drawert (1951) festgestellt haben, verändert werden. Insbesondere mußte dies von dem Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer angenommen werden, dessen toxischer Einfluß auf die lebende Hefe deshalb besonders geprüft wurde. Ich suspendierte hierfür 5 g frischer Hefe in 100 ml des Puffers (pH 2,73). Nach 1 Stunde zentrifugierte ich die Hefe von der Pufferlösung ab und wusch sie viermal hintereinander in aqua dest. aus. Die Lebendprüfung geschah durch Anfärben der Hefe mit einer Acridin-orangelösung 1 : 10 000 (Strugger 1944) und durch Ermittlung der katarphoretischen Wanderungsrichtung der Zellen in einem 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer (pH 2,4), in dem lebende Hefezellen sich zur Kathode bewegen, während tote anodisch wandern (vgl. Tab. 2). Es ist dabei festgestellt worden, daß noch mehr als 95% der Hefezellen lebten. Ebenso fiel eine Gärprobe in 5%iger Rohrzuckerlösung positiv aus und ergab gegenüber der Kontrolle mit lebender unbehandelter Hefe keinen Unterschied in der Gärungsintensität. Zudem wies die Hefe bei 28° C ein normales Wachstum auf. Die Giftwirkung des Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffers war also so gering, daß sie bei den Versuchen vernachlässigt werden konnte.

Es ist also tatsächlich so, daß die lebende Hefe in stärker sauren Bereichen der  $\text{cH}^+$  des Suspensionsmittels je nach der Art des Säureanions des verwendeten Puffers einmal konsequent kathodisch wandert, zum andern aber auch mit steigender  $\text{cH}^+$  die Wanderungsrichtung wechselt und sich mehr oder weniger stark zur Anode bewegen kann.

Hefezellen, die durch Hitze abgetötet worden waren, zeigten in der Reihe der  $\text{cH}^+$  (0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer) einen dreimaligen Wechsel der Wanderungsrichtung (vgl. Tab. 2, Pos. 2). War die  $\text{cH}^+$  größer als pH 2,59, dann bewegten sich die Zellen zur Anode. Zwischen pH 2,59 und pH 3,06, besonders aber bei pH 2,85, wanderten sie kathodisch. Im Bereich zwischen pH 3,06 und pH 3,30 bewegten sie sich wieder in verstärktem Maße zur Anode, während bei niedrigeren  $\text{cH}^+$ -Werten als pH 3,30 die tote Hefezelle ebenso wie die lebende konsequent zur Kathode wanderte. Dieses Verhalten der toten Hefezelle ist ähnlich wie das der lebenden in dem Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer, wo auch ein mehrmaliger Wechsel der Wanderungsrichtung erfolgte. Solches Schwanken des Vorzeichens im Adsorptionspotential um den Nullwert, wie es in stärker sauren Dispersionsmedien beobachtet werden kann, ist also sowohl mit toten als auch mit lebenden Hefezellen zu demonstrieren.



Das kataphoretische Verhalten der toten Hefezelle scheint stark von der Art und der Intensität der Hitzebehandlung abhängig zu sein. Läßt man nämlich die Hefesuspension, nachdem sie im Wasserbad auf 100° C erhitzt worden ist, noch mehrere Minuten über direkter Flamme sprudelnd kochen,

Tab. 2. *Kataphoretische Wanderungsrichtung lebender und hitzefixierter Hefezellen bei abgestuften Werten der  $cH^+$  eines Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffers.* (K = kathodische Wanderung, A = anodische Wanderung.)

	I	II	III
pH 2,40	K	A	A
pH 2,59	K	K(A)	K(A)
pH 2,85	K	K	K A
pH 3,06	K	K(A)	K(A)
pH 3,30	K	K A	K(A)
pH 3,51	K	K	K
pH 3,76	K	K	K
pH 4,03	K	K	K
pH 4,28	K	K	K
pH 4,46	K	K	K
pH 4,72	K	K	K
pH 4,93	K	K	K
pH 5,17	K	K	K
pH 5,39	K	K	K
pH 5,54	K	K	K
pH 5,77	K	K	K
pH 5,97	K	K	K
pH 6,12	K	K	K
pH 6,42	K	K	K
pH 6,58	K	K	K
pH 6,76	K	K	K
pH 6,88	K	K	K
pH 7,03	K	K	K
pH 7,16	K	K	K
pH 7,36	K	K	K
pH 7,50	K	K	K
pH 7,66	K	K	K
pH 7,86	K	K	K
pH 8,00	K	K	K

I = lebende Hefe.

II = hitzefixierte Hefe (auf 100° C erhitzt, ohne Kochen).

III = hitzefixierte Hefe (nach dem Erhitzen auf 100° C 3 Minuten sprudelnd gekocht).

dann fehlt nachher die rein kathodische Wanderung zwischen pH 2,59 und pH 3,06, und es ist zwischen pH 2,59 und pH 3,30 nur ein allmählicher Übergang von der anodischen zur kathodischen Wanderung zu vermerken.

In den Tabellen findet man die Bezeichnungen (K) A oder auch K A oder K (A), was anzeigen soll, daß in dem betreffenden Bereich der  $cH^+$  sowohl Zellen, die kathodisch, als auch Zellen, die anodisch wandern, vor-



kommen, wobei das Einklammern einen minderen Anteil der Art andeutet. Der oben gebrauchte Ausdruck „allmählicher Übergang“ soll also aussagen, daß bei einer  $\text{cH}^+$  höher als pH 2,59 wenige Zellen und auf pH 3,30 zu mehr und mehr Zellen ihre Bewegung in die Richtung zur Kathode umkehren, während der jeweilige Rest die Bewegung zur Anode noch beibehält. Unter solchen Umständen ist der Zustand der kataphoretischen Unbeweglichkeit, d. h. die Elektroneutralität, nur noch eine berechenbare, aber nicht mehr wahrnehmbare Größe.

### Besprechung der Ergebnisse

Es wurde festgestellt, daß die Hefezellen in neutralen bis schwach sauren und auch noch in verhältnismäßig stark sauren Pufferlösungen im Kataphoreseversuch kathodisch wanderten. Das Ergebnis steht im Gegensatz zu dem, was Kölbel (1947) und Drawert (1951) berichtet haben. Beide Autoren stimmten darin überein, daß die Hefezellen anionisch geladen sind und auch anodisch wandern.

Wenn Kölbel und Drawert nicht sowohl die Wanderungsrichtung als auch die aktuelle Ladung als anodisch bzw. anionisch bezeichnet hätten, dann wäre kein Widerspruch gegeben. Die Hefezellen haben in schwach sauren Puffer- oder Salzlösungen tatsächlich eine anionische Ladung; sie nehmen im Austausch gegen Wasserstoffionen in der Hauptsache Kationen aus der Lösung auf, ihre Ampholytladung muß deshalb anionisch sein. Sie wandern in der Kataphorese aber nicht zur Anode, sondern zur Kathode, weil sie mit den adsorbierten und im gegebenen Moment dissoziierenden und leicht austauschbaren Ionen wandern. Der Gegensatz zwischen den Kölbel'schen und Drawert'schen Beobachtungen einerseits und meinen Beobachtungen andererseits resultiert also nicht aus verschiedenen Auffassungen über die Ladung der Zellsubstanz, die einheitlich bezeichnet wird, sondern aus verschiedenen Feststellungen über die Wanderungsrichtung.

Hierüber kann man zu verschiedenen Meinungen kommen, wenn das, was in der Kataphoresekammer vorgeht, nicht einheitlich beurteilt wird. In meinen Versuchen hat sich herausgestellt, daß die Wanderungsrichtung der Zellen erst dann beurteilt werden darf, wenn die suspendierten Zellen sedimentiert sind und eine in der vertikalen Schichtung unveränderliche Einstellung der Ladungsdichten erreicht ist. In der bodennahen Schicht ist dann mit den sedimentierten Adsorbentien eine dichte Ansammlung der Adsorbatladungen gegeben, nach deren Vorzeichen die kataphoretische Wanderung und die elektroosmotische Bewegung des Dispersionsmittels erfolgt. Unter dieser Voraussetzung habe ich erfahren, daß die Hefezellen in schwach sauren Pufferlösungen in jedem Falle sich zur Kathode bewegen. Was in stark sauren Lösungen geschieht, kann in Abhängigkeit vom Anionencharakter der Pufferlösung unterschiedlich sein. In einigen Puffern wandern die Zellen in stark sauren ebenso wie in schwach sauren Bereichen der  $\text{cH}^+$  zur Kathode. In anderen Puffern zeigte sich dagegen in Bereichen relativ hoher  $\text{cH}^+$  eine Änderung der Wanderungsrichtung, was eine Wan-

derung zur Anode zur Folge hatte. Bei der Bildung eines Urteils aus dieser Tatsache heraus sind folgende Momente in Betracht zu ziehen:

1. Würde die Wanderungsrichtung des suspendierten Teilchens (Zelle) von der Ladung der ponderablen Substanz (Adsorbens) bestimmt, dann müßte man die Zelle als kationisch geladen ansehen. Man müßte dann entsprechend weiter urteilen, daß mit zunehmender  $\text{cH}^+$  der Lösung die Dissoziation der an diese Kationen assoziierten Anionen, insbesondere der Hydroxylionen, steigt und die kathodische Wanderung zunimmt. Im Gegensatz dazu ist aus den Versuchen zu sehen, daß mit zunehmender  $\text{cH}^+$  eher ein Umkehr zur anodischen Wanderung zu erwarten ist.

2. Wäre die Zelle ein Ampholyt mit einer kataphoretischen Wanderung im sauren Medium, wie sie unter 1. angenommen wurde, und dazu der Ladungswechsel nur von einer antipathen Beziehung der Dissoziationen von Wasserstoff- und Hydroxylionen abhängig, dann könnte der Umschlag in die andere Wanderungsrichtung nur durch eine Änderung der  $\text{cH}^+$  verursacht sein. Im Gegensatz dazu ist aus den Versuchen zu ersehen, daß der Anionencharakter des Puffers entscheidet, ob und bei welcher  $\text{cH}^+$  ein Wechsel der Wanderungsrichtung erfolgt.

3. Aus 1. und 2. resultiert, daß nicht die Ladung der ponderablen Substanz (Adsorbens) den Wanderungscharakter des Teilchens bestimmt. Es wird vom adsorbierten Ion (Adsorbat) und dessen Dissoziation beherrscht. Vergleicht man die kataphoretischen Wanderungen in verschiedenen Säuremedien mit unterschiedlicher  $\text{cH}^+$ , dann ist im Medium mit relativ geringer  $\text{cH}^+$  eine stärkere Dissoziation der adsorbierten Wasserstoffionen als in dem Medium mit relativ hoher  $\text{cH}^+$  zu erwarten. Sofern die Wanderungsrichtung nicht von der Ladung des Adsorbens, sondern vom dissoziierenden Adsorbat bestimmt wird, muß die Wahrscheinlichkeit der kathodischen Wanderung mit verminderter  $\text{cH}^+$  des Mediums steigen. Wie weit durch Austausch adsorbierte andere Kationen mitbestimmend sind, wird sich nur bei genauerer Kenntnis der Lösungsverhältnisse des Einzelfalles beurteilen lassen. Umgekehrt muß mit steigender  $\text{cH}^+$  die Wahrscheinlichkeit der kathodischen Wanderung geringer und die Wahrscheinlichkeit der anodischen Wanderung größer werden. Bei hoher  $\text{cH}^+$  ist aber auch eine hohe Konzentration der Säureanionen zu erwarten, die einen Austausch mit den Hydroxylionen erzwingen, was zur Folge hat, daß nun nicht die Dissoziationskonstante der Verbindung Adsorbens-Hydroxylion, sondern die Dissoziationskonstante der Verbindung des Adsorbens mit dem ausgetauschten Säureanion das Feld beherrscht. Die Säureanionen beherrschen das, was im stärker sauren Medium geschieht, in zweifacher Weise. Erstens beeinflusst ihr Charakter die Dissoziation der Säure, aus der sie stammen, wovon ihre Austauschfähigkeit abhängt. Zweitens beeinflusst ihr Charakter nach erfolgtem Austausch die Dissoziation der Adsorptionsbindung. Hieraus resultiert die Erscheinung, daß im verhältnismäßig stark sauren Medium der Wechsel zur anodischen Wanderung beginnt und die Entscheidung zur Frage, ob und wo der Wechsel in der  $\text{cH}^+$ -Reihe einsetzt, vom Anionencharakter der Säure des Puffers abhängt.

Was Drawert (1951) im Gegensatz zu Kölbel (1947) zeigte, daß nämlich „nach Vitalfärbung mit stärker dissoziierten basischen Farbstoffen“ verschiedene Umschlagpunkte der kataphoretischen Wanderung je nach den Dissoziationsgraden der Farbstoffe zu beobachten sind, kann mit dem gleichen Prinzip erklärt werden, mit dem die Rolle der Säureanionen erklärt wurde. Die adsorbierten Farbstoffkationen dissoziieren je nach ihrem Charakter unterschiedlich aus der Adsorptionsbindung und wahrscheinlich insgesamt weniger als das Wasserstoffion oder andere Kationen. Sie haben andererseits große Teile der negativen Ladung des Adsorbens besetzt, so daß die Bedeutung dissoziierender Kationen vermindert ist und die Bedeutung der dissoziierenden Anionen vorherrschen kann.

Was weder hier in meinen Versuchen noch in den oben zitierten Versuchen von Drawert (1951) aus den Anionen- und den Kationencharakteren heraus erklärt werden kann, ist der wiederholte Wechsel der Wanderungsrichtung in dem stärker sauren Bereich, in dem der Wechsel überhaupt stattfand. Über die Ursachen dieses wiederholten Wechsels der kataphoretischen Wanderungsrichtung der Hefezelle wird in einer weiteren Mitteilung zu berichten sein.

### Zusammenfassung

Die Wanderungsrichtung bei der Kataphorese der Hefezellen wird durch adsorbierte, im gegebenen Fall dissoziierende und deshalb austauschbare Ionen bestimmt.

Dissoziieren vornehmlich Anionen, dann ist eine anodische, dissoziieren mehr Kationen, dann ist eine kathodische Wanderung zu erwarten.

Die Art der beherrschenden Dissoziation ist nicht nur von der  $\text{cH}^+$ , sondern, wie hier z. B. festgestellt wurde, auch vom besonderen Charakter der bei hoher  $\text{cH}^+$  durch Austausch in die Adsorption gehenden Anionen abhängig. Es muß dabei erwartet werden, daß artungleiche Anionen mit dem Adsorbens jeweils eine Bindung mit eigener Dissoziationskonstante geben.

Unter diesen Voraussetzungen kann kein Dissoziationsgleichgewicht der Anionen und Kationen bei einer bestimmten  $\text{cH}^+$ , also kein  $\text{IEP}_M$  der Hefezelle, erwartet werden. Das Dissoziationsgleichgewicht der Hefezelle muß bei der Anwendung verschiedener Säuren, Basen bzw. Salze im Puffer des Suspensionsmittels bei unterschiedlicher  $\text{cH}^+$  gegeben sein.

Über analoge Kationenwirkungen und besondere Erscheinungen, die sich aus dem Umstand ergeben, daß eine Zelle mehrere Ampholyte enthält, die sich unterschiedlich verhalten, wird in künftigen Abhandlungen berichtet.

### Literatur

- Drawert, H., 1951: Zur Frage der Bestimmung des isoelektrischen Punktes von lebendem Plasma. *Z. Naturforsch.* 6 b, 141.  
— 1952: Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes lebenden Plasmas. *Z. Naturforsch.* 7 b, 119.  
Fritze, E., 1952: Die elektrische Ladung suspendierter Zellen. *Naturw.* 39, 25.

- Gicklhorn, J., und K. Umrath, 1928: Messung elektrischer Potentiale pflanzlicher Gewebe und einzelner Zellen. *Protoplasma* 4, 228.
- Kölbel, H., 1947: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. *Z. Naturforsch.* 2b, 382.
- 1948: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. *Z. Naturforsch.* 3b, 442.
- 1949: Zur Kenntnis und kataphoretischen Bestimmung des isoelektrischen Punktes einiger Bakterien. *Z. Naturforsch.* 4b, 145.
- 1952: Zur Frage der Bestimmung des isoelektrischen Punktes von lebendem Plasma. *Z. Naturforsch.* 7b, 117.
- Michaelis, L., und J. Davidsohn, 1910: Zur Theorie des isoelektrischen Punktes. *Biochem. Z.* 30, 143.
- Smoluchowski, M. von, 1921: Elektrische Endosmose und Strömungsströme. *Handb. Elektr. u. Magnet.* 2, 366, Leipzig 1921.
- Stearn, A. E., and E. W. Stearn, 1931: Metathetic equilibria of bacterial systems with special reference to bacteriostasis and bacterial flocculation. *Protoplasma* 12, 580.
- Strugger, S., 1944: Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezellen. *Flora* 137, 73.

## Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen

### II. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Kataphorese

Von

**Arnold Wartenberg**

Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
(Direktor: Prof. Dr. H. Wartenberg)

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. März 1956)

In einer ersten Mitteilung (A. Wartenberg 1956) wurde berichtet, daß die Wanderungsrichtung der Hefezelle im Kataphoreseversuch durch die Ladung der Ionen bestimmt wird, die an die Zellampholyte adsorbiert sind. Es regelt also hier zunächst nicht das Adsorbens, sondern das Adsorbat das Verhalten der Hefezelle. Die Umkehr der Bewegungsrichtung von der kathodischen zur anodischen Wanderung, wie sie in stärker sauren Suspensionsmitteln stattfindet, ist auch nicht allein eine Funktion der  $\text{cH}^+$ , wie man es aus der Theorie des IEP annehmen sollte. Das Einsetzen der Richtungsumkehr und der Wert des  $\text{cH}^+$ -Bereiches, bei dem sie zustande kommt, werden vom Charakter der Anionen der als Suspensionsmittel verwendeten Pufferlösung mitbeherrscht.

Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Umkehr in die entgegengesetzte Wanderungsrichtung im stärker sauren Bereich der  $\text{cH}^+$  nicht nur einmal, sondern mehrmals hin und her erfolgen kann. In einem ungenau umgrenzten Bereich des Nullwertes der kataphoretischen Wanderung schwankt mit steigender  $\text{cH}^+$  die Wanderungsrichtung von der kathodischen in die anodische und wieder in die kathodische und schließlich wieder in die anodische Wanderung. Warum dies geschieht, blieb eine unbeantwortete Frage.

Aus diesem Grunde mußte untersucht werden, ob bei den Wanderungen der Hefezelle, wie sie bei verschiedener  $\text{cH}^+$  des Dispersionsmittels beobachtet werden konnten, auch Unterschiede und Schwankungen der Wanderungsgeschwindigkeit auftreten. Ferner mußte untersucht werden, ob verschiedene Säureanionen die Geschwindigkeit der kataphoretischen Wanderungsrichtung unterschiedlich beeinflussen.

Der Kataphoreseversuch birgt als Methode noch Möglichkeiten, die bis-

her noch nicht ausgenutzt wurden. Es muß möglich sein, entsprechend den Anschauungen von Stearn und Stearn (1931) die verschiedenen IEP eines Gemisches mehrerer unterschiedlicher Ampholyte einzeln zu messen. Es muß dies auch möglich sein, ohne daß das ganze Gemisch seinen Ladungssinn zu ändern braucht. Wenn jeder Ampholyt des Gemisches in der Reihe verschiedener  $\text{cH}^+$  des Dispersionsmittels seine Ladung für sich ändert, dann muß der IEP jedes einzelnen Ampholyten bei gleichbleibendem Ladungssinn des ganzen Gemisches durch Schwankungen der Ladungsgröße zum Ausdruck kommen, sofern die IEP der verschiedenen Ampholyte genügend weit voneinander entfernt sind. Das Schwanken der Wanderungsrichtung der Hefezelle um den Nullwert, wie es beschrieben wurde, deutet einen solchen Einfluß des einzelnen Ampholyten auf die Wanderungsgeschwindigkeit an. Liegen die IEP in enger Streuung um einen Mittelwert, dann müssen sie ein methodisch untrennbares gemeinsames Minimum freier Ladung ( $\text{IEP}_M$ ) bilden. Liegen sie dagegen in weiter Streuung, dann müssen sie zwar in der  $\text{cH}^+$ -Reihe einen gemeinsamen Abfall und ein gemeinsames Ansteigen der Ladung im Sinne der Veränderung einer mittleren Ladung demonstrieren; die Kurve des Abfalls und des Ansteigens kann dann aber nicht kontinuierlich sein. Sie muß dort Verstärkungen und Hemmungen in der Minderung freier Ladung haben, wo die Reihe der veränderten  $\text{cH}^+$  sich dem individuellen IEP eines Ampholyten nähert und ihn überschreitet. Im Abfall der gemeinsamen freien Ladung muß der individuelle IEP sich als Verstärkung und Hemmung zeigen und im Ansteigen der gemeinsamen freien Ladung muß er umgekehrt als Hemmung und nachfolgendes steileres Ansteigen zum Ausdruck kommen.

Diese methodische Möglichkeit der Kataphoreseversuche war die Arbeitshypothese der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen über die isoelektrische Reaktion und über das Adsorptionspotential der Pflanzenzelle.

### Fragen der Methodik

Die Kataphoreseapparatur wurde schon in der ersten Mitteilung (A. Wartenberg 1956) beschrieben.

Die Geschwindigkeiten der Hefezellen sind unter den gleichen Voraussetzungen wie die Richtungen ihrer kataphoretischen Wanderungen festgestellt worden, d. h. die Messung der Geschwindigkeit begann erst dann, wenn alle suspendierten Hefezellen durch das Sedimentieren auf dem Boden der Kataphoresekammer angesammelt waren. Die Zellen hatten dann ziemlich gleichmäßige Geschwindigkeit. Die Mittelwerte eines unvermeidlichen aber engen Schwankungsbereiches waren gut reproduzierbar. Eine Wiederholung der Messung an 25 verschiedenen Hefezellen erwies sich als ausreichend, um gesicherte Mittelwerte der Wanderungsgeschwindigkeit zu erzielen. Die Stoppuhr, mit der ich die Messung ausführte, hatte eine Ablesegenauigkeit von 0,05 Sekunden.

Die Pufferlösungen waren die gleichen, die für die Bestimmung

der kataphoretischen Wanderungsrichtung der Hefezellen verwandt worden waren (A. Wartenberg 1956) (0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer, 0,1 mol Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer, 0,1 mol Essigsäure-Natriumazetat-Puffer, 0,1 mol Natriumphosphat-Puffer).

Mit Hefezellen im Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer war es nicht möglich, eine Wanderungsgeschwindigkeit zu messen. In diesem Puffer ist eine kataphoretische Wanderung der Hefezellen eigentlich nicht festzustellen. Es bewegen sich nach Veränderungen der  $\text{cH}^+$  einige Zellen kathodisch, im anderen Falle eine größere Anzahl anodisch. In jedem Falle ist die Wanderung aber so langsam, daß ihre Messung mit großen Fehlern behaftet sein muß. Wenn daher im folgenden von der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Hefe im Oxalsäure-Natriumoxalatpuffer gesprochen wird, so handelt es sich nur um die Schwankung der Wanderungsrichtung im Bereich des Nullwertes der Geschwindigkeit der Hefe in diesem Puffer (vergl. A. Wartenberg 1956, Tab. 1), von der aus auf eine entsprechende Schwankung der Wanderungsgeschwindigkeit geschlossen werden kann.

### Ergebnisse der Versuche

Bei der Frage nach den Geschwindigkeitsunterschieden der kataphoretischen Wanderungen von Hefezellen, wie sie sich unter den Bedingungen verschiedener  $\text{cH}^+$  der Lösungen herausstellen können, ist als zweite Besonderheit zu beachten, ob verschiedene Puffer, die in ein und demselben Bereich gleiche Abstufungen der  $\text{cH}^+$  bewirken, auf Grund ihrer verschiedenen Anionen die Geschwindigkeit der kataphoretischen Wanderung der Hefe unterschiedlich beeinflussen. Um solches festzustellen, wurden die Wanderungsgeschwindigkeiten der Hefezellen im  $\text{cH}^+$ -Bereich von pH 5,0 bis pH 6,5 in einem Essigsäure-Natriumazetat-Puffer (0,1 mol) und vergleichsweise in einem Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer (0,1 mol) gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 1 dargestellt.

Das Kurvenbild ist in zwei Merkmalen auffallend. Zunächst fällt auf, daß in den Schwankungen der Geschwindigkeit über der Reihe der  $\text{cH}^+$  Hefezellen im Essigsäure-Natriumazetat-Puffer im ganzen  $\text{cH}^+$ -Bereich fast die dreifache Wanderungsgeschwindigkeit haben. Dann fällt auf, daß in den Schwankungen der Geschwindigkeit über der Reihe der  $\text{cH}^+$  qualitativ fast genaue Übereinstimmung besteht, nur quantitativ, d. h. in den Reichweiten der Exzesse erweist sich, daß die größeren Geschwindigkeiten unter den Bedingungen des Essigsäure-Natriumazetat-Puffers auch größere Schwankungen haben. Der Unterschied zwischen den durchschnittlichen Geschwindigkeiten einerseits und die qualitative Übereinstimmung der Schwankungen über der  $\text{cH}^+$ -Reihe andererseits sind zwei Erscheinungen, die näher erklärt werden müssen.

Das eine läßt vermuten, daß die Puffer mit den Anionen ihrer Säuren entweder die wandernde Zelle oder das Substrat, in welchem die Wanderung stattfindet, spezifisch beeinflussen. Dieses aufzuklären, ist nötig, wenn auch zunächst die Erkenntnis genügen würde, daß zur Frage der Wanderungsgeschwindigkeit im Kataphoreseversuch der Anionencharakter der



Puffersäure zu beachten ist; was andererseits darauf hinweist, daß vielleicht auch der Kationencharakter des Puffersalzes nicht außer Betracht bleiben darf.

Aus Gründen der methodischen Sicherheit mußte vor dem weiteren Ausbauen der Versuche eine Vorstellung darüber gewonnen werden, wie

Essigsäure-Natriumazetat-Puffer		
pH 4,96	M = 12,35 ± 0,392 µl/Sek.	n = 25
pH 5,13	M = 10,33 ± 0,330 µl/Sek.	
pH 5,25	M = 10,44 ± 0,285 µl/Sek.	
pH 5,36	M = 10,30 ± 0,299 µl/Sek.	
pH 5,56	M = 17,20 ± 0,406 µl/Sek.	
pH 5,65	M = 10,02 ± 0,224 µl/Sek.	
pH 5,78	M = 12,95 ± 0,321 µl/Sek.	
pH 5,85	M = 11,40 ± 0,370 µl/Sek.	
pH 5,91	M = 9,28 ± 0,471 µl/Sek.	
pH 6,10	M = 12,20 ± 0,305 µl/Sek.	
pH 6,21	M = 13,43 ± 0,336 µl/Sek.	
pH 6,26	M = 10,45 ± 0,542 µl/Sek.	
pH 6,36	M = 8,97 ± 0,269 µl/Sek.	
Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer		
pH 4,93	M = 4,79 ± 0,149 µl/Sek.	n = 25
pH 5,17	M = 4,45 ± 0,164 µl/Sek.	
pH 5,39	M = 4,35 ± 0,097 µl/Sek.	
pH 5,53	M = 7,91 ± 0,185 µl/Sek.	
pH 5,63	M = 5,08 ± 0,149 µl/Sek.	
pH 5,85	M = 7,36 ± 0,145 µl/Sek.	
pH 5,97	M = 5,63 ± 0,126 µl/Sek.	
pH 6,12	M = 6,53 ± 0,135 µl/Sek.	
pH 6,24	M = 7,40 ± 0,143 µl/Sek.	
pH 6,42	M = 3,93 ± 0,098 µl/Sek.	

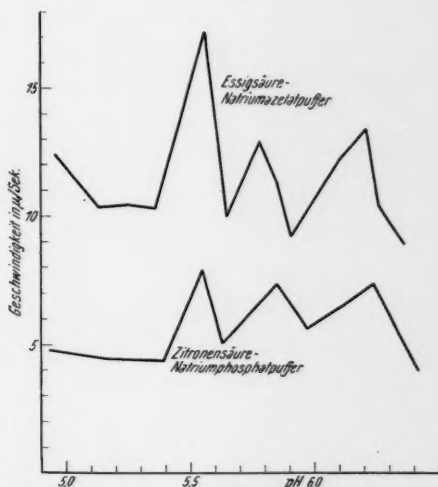


Abb. 1. Kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Hefezellen in abgestuften Essigsäure-Natriumazetat-Puffern (0,1 mol) und Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern (0,1 mol).

weit die elektrostatische Ladung und die Wanderungsgeschwindigkeit der Hefezelle bei gleichbleibender  $\text{cH}^+$  von unterschiedlich molaren Konzentrationen des Puffers beeinflusst wird. Es war anzunehmen, daß die erhöhte Konzentration einen verstärkten Kationen- und Anionenaustausch erzwingt und die hohe Konzentration außerdem einen Assoziationszwang auf die adsorbierten Ionen ausüben muß. Die Adsorption und die strenge Assoziation der Ionen müssen dann eine mindere Ladung, also eine verminderte Wanderungsgeschwindigkeit zum Ausdruck bringen. Es war nicht vorauszusehen, in welcher Größenordnung der Konzentrationseffekt erwartet werden kann. Um in den Dingen zu einer Vorstellung zu kommen, wurde die Wanderungsgeschwindigkeit der Hefe in fünf verschiedenen konzentrierten Zitronensäure-Natriumzitat-Puffern gemessen, die alle auf die gleiche  $\text{cH}^+$  abgestimmt waren. Fünf verschieden konzentrierte Lösungen eines Puffers mit gleicher  $\text{cH}^+$  herzustellen, ist nicht möglich. Es gelingt annähernd, aber nicht ganz genau. Ich wählte deshalb einen Bereich der  $\text{cH}^+$ , in welchem, wie ich in Erfahrung gebracht hatte, die Wanderungsgeschwindigkeit der Hefe bei

gleicher Konzentration des Puffers in einer verhältnismäßig weiten Spanne der  $\text{cH}^+$  gleichmäßig war. Wenn in diesem Bereich der  $\text{cH}^+$  geringe Aziditätsunterschiede der verschiedenen konzentrierten Puffer unvermeidlich sind, dann können sie auf die Wanderungsgeschwindigkeit keinen nennenswerten Einfluß haben. Führen hier Unterschiede der molaren Konzentration zu Geschwindigkeitsunterschieden der kataphoretischen Wanderung der Zellen, dann können sie nicht auf die unvermeidbaren Unterschiede in der  $\text{cH}^+$  zurückgeführt werden, sie sind dann Effekte der Unterschiede der verschiedenen molaren Konzentrationen.

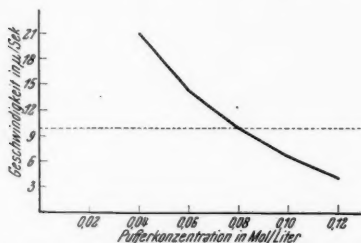


Abb. 2. Kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Hefezellen in verschiedenen konzentrierten Zitronensäure-Natriumzitat-Puffern gleicher  $\text{cH}^+$ . Die gestrichelte waagrechte Linie zeigt den maximalen Wert an, bis zu welchem die Wanderungsgeschwindigkeit der Hefe in 0,1 mol Zitronensäure-Natriumzitat-Puffern bei variierender  $\text{cH}^+$  anzuheben vermag.

0,04 mol (pH 5,45)	$M = 21,05 \pm 0,424 \mu/\text{Sek.}$	} $n = 25$
0,06 mol (pH 5,38)	$M = 14,24 \pm 0,226 \mu/\text{Sek.}$	
0,08 mol (pH 5,34)	$M = 10,08 \pm 0,365 \mu/\text{Sek.}$	
0,10 mol (pH 5,31)	$M = 6,62 \pm 0,165 \mu/\text{Sek.}$	
0,12 mol (pH 5,29)	$M = 3,91 \pm 0,245 \mu/\text{Sek.}$	

verschiedene andere Säureanionen hatten. Ich nahm hierzu einen Natriumphosphatpuffer (0,1 mol), der aus primärem und sekundärem Natriumphosphat bestand, sowie einen Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer (0,1 mol), zwei Pufferlösungen also, deren Säureanionen schon in dem ersten Versuch in einem gemeinsamen Puffergemisch enthalten waren. Als drittes Puffersystem wählte ich einen 0,1 mol. Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3 dargestellt. Aus dem Vergleich der drei Kurven ist noch nicht die spezifische Säureanionenwirkung zu erkennen, denn die drei Puffer bewirken ja drei sehr unterschiedliche Bereiche der  $\text{cH}^+$ . Das Ganze sieht zunächst so aus, als ob die Wanderungsgeschwindigkeit eine Funktion der  $\text{cH}^+$  sei, wobei die Geschwindigkeit der Hefezelle im Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer nicht nur einen Nullpunkt erreicht, sondern auch einen Umschlag zur anodischen Wanderung erfährt und in der umgekehrten Wanderungsrichtung wieder ansteigen kann. Be-

Das Ergebnis des Versuches ist in Abb. 2 dargestellt. Es zeigt, daß mit einer Erhöhung der molaren Konzentration des Puffers bei annähernd gleichbleibender  $\text{cH}^+$  die

Wanderungsgeschwindigkeit der Hefezellen geringer wird und sich asymptotisch dem Wert Null nähert. Der Effekt der molaren Konzentration ist also eine Fehlerquelle, die streng beachtet werden muß.

Um weitere Kenntnisse über die spezifische Wirkung der Anionen zu gewinnen, wurde der Versuch zu Abb. 1 mit drei Puffern wiederholt, die

trachtet man aber das Verhalten der Hefezellen im Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer, dann zeigt sich dort etwas, was nichts mit der  $cH^+$  allein zu tun hat. Zwischen pH 6,08 und pH 6,45 sind in ihm die Hefezellen in einem

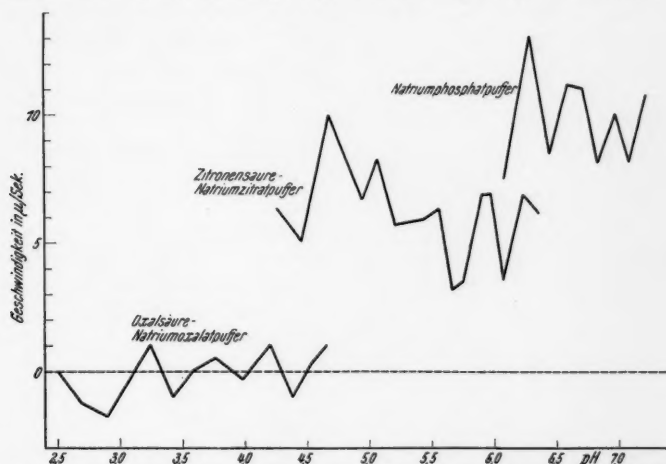


Abb. 3. Kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Hefezellen in 0,1 mol Zitronensäure-Natriumzitat-Puffern und 0,1 mol Natriumphosphatpuffern. Die Exzesse in der Kurve des 0,1 mol Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffers resultieren aus dem bei der jeweiligen  $cH^+$  Mehr- oder Wenigerüberwiegen der kathodischen oder anodischen Wanderungsrichtung.

#### Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer

pH 4,26	M = 6,36 ± 0,215 µ/Sek.
pH 4,46	M = 5,02 ± 0,246 µ/Sek.
pH 4,68	M = 10,00 ± 0,295 µ/Sek.
pH 4,94	M = 7,05 ± 0,103 µ/Sek.
pH 5,06	M = 8,33 ± 0,299 µ/Sek.
pH 5,20	M = 5,78 ± 0,138 µ/Sek.
pH 5,44	M = 5,96 ± 0,221 µ/Sek.
pH 5,55	M = 6,36 ± 0,126 µ/Sek.
pH 5,66	M = 3,24 ± 0,148 µ/Sek.
pH 5,75	M = 3,52 ± 0,112 µ/Sek.
pH 5,91	M = 6,95 ± 0,218 µ/Sek.
pH 5,97	M = 6,97 ± 0,190 µ/Sek.
pH 6,07	M = 3,62 ± 0,099 µ/Sek.
pH 6,23	M = 6,94 ± 0,180 µ/Sek.
pH 6,35	M = 6,22 ± 0,241 µ/Sek.

$n = 25$

#### Natriumphosphatpuffer

pH 6,08	M = 7,64 ± 0,167 µ/Sek.
pH 6,29	M = 13,10 ± 0,460 µ/Sek.
pH 6,44	M = 8,51 ± 0,137 µ/Sek.
pH 6,59	M = 11,20 ± 0,187 µ/Sek.
pH 6,71	M = 11,08 ± 0,226 µ/Sek.
pH 6,83	M = 8,19 ± 0,124 µ/Sek.
pH 6,97	M = 10,08 ± 0,226 µ/Sek.
pH 7,08	M = 8,26 ± 0,142 µ/Sek.
pH 7,22	M = 10,86 ± 0,249 µ/Sek.

$n = 25$

Bereich der  $cH^+$ , den auch der saure Teil des Phosphatpuffers einnimmt. In diesem Phosphatpuffer haben die Hefezellen aber in dem gleichen Bereich der  $cH^+$  eine stärkere elektrostatische Ladung, d. h. eine größere Wanderungsgeschwindigkeit in kathodischer Richtung als im Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer.

Es scheint die Wanderungsgeschwindigkeit im Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer mit steigender  $\text{cH}^+$  eine Beschleunigung zu erfahren, was aber eine Täuschung sein kann, weil hier ein Anstieg in den diskontinuierlichen Schwankungen der Ladungen, d. h. der Geschwindigkeitskurven den Wert

des scheinbaren kontinuierlichen Ladungsanstieges haben kann.

Es ist zweifellos, daß die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung der Hefezellen mit dem Ansteigen der  $\text{cH}^+$  abnimmt und im stärker sauren Bereich allgemein die Tendenz zum Umschlag in die Richtung der anodischen Wanderung besteht. Letzteres zeigten schon die Versuche zur Feststellung der Wanderungsrichtung (A. Wartenberg 1956). Dort zeigte sich aber auch, daß der Richtungswechsel nicht in jeder Pufferlösung zu erwarten ist. Hier ergibt sich nun, daß der Richtungsumschlag in einem Puffer eintritt, in dem die Hefezellen an und für sich wenige elektrostatische Ladungen aufweisen. Wenn in einem anderen Puffer mit gleichem Bereich des  $\text{cH}^+$ -Anstieges der Umschlag in die andere Wanderungsrichtung nicht erfolgt, dann muß die Ursache irgendwie damit zusammenhängen, daß die Hefezellen in diesem anderen Puffer viele freie positive Ladungen haben, womit, wie schon angedeutet wurde, größere Exzesse der diskontinuierlichen Schwankungen verknüpft sind.

Die Erscheinung, daß mit zunehmender  $\text{cH}^+$  des Dispersionsmittels die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung in der Regel abnimmt, ist ursächlich zu verstehen, wenn man voraussetzt, daß die Teilchen

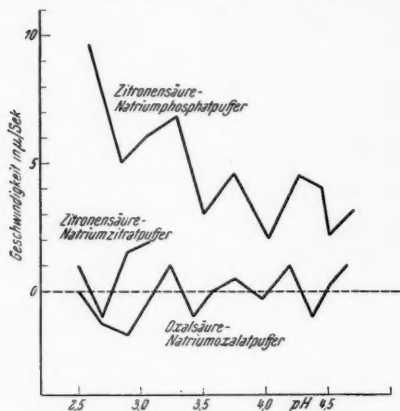


Abb. 4. Kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Hefezellen in 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern. Die Vergleichskurven (0,1 mol Zitronensäure-Natriumzitat-Puffer und 0,1 mol Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer) ergeben sich aus der bei der jeweiligen  $\text{cH}^+$  mehr oder weniger überwiegenden kathodischen oder anodischen Wanderungsrichtung.

#### Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer

pH 2,59	$M = 9,62 \pm 0,449 \mu/\text{Sek.}$	} $n = 25$
pH 2,85	$M = 5,05 \pm 0,269 \mu/\text{Sek.}$	
pH 3,06	$M = 6,08 \pm 0,257 \mu/\text{Sek.}$	
pH 3,30	$M = 6,83 \pm 0,241 \mu/\text{Sek.}$	
pH 3,51	$M = 3,04 \pm 0,425 \mu/\text{Sek.}$	
pH 3,76	$M = 4,60 \pm 0,157 \mu/\text{Sek.}$	
pH 4,03	$M = 2,08 \pm 0,344 \mu/\text{Sek.}$	
pH 4,28	$M = 4,53 \pm 0,188 \mu/\text{Sek.}$	
pH 4,46	$M = 4,04 \pm 0,109 \mu/\text{Sek.}$	
pH 4,51	$M = 2,23 \pm 0,323 \mu/\text{Sek.}$	
pH 4,72	$M = 3,19 \pm 0,101 \mu/\text{Sek.}$	

der dispersen Phase, hier also die ponderable Zellsubstanz, mit den adsorbierten Ionen, d. h. auf Grund der Ladung des Sorbates wandern. Da es sich hier um Sorbentien mit amphoterem Charakter handelt, also sowohl Kationen als Anionen adsorbiert werden können, ist zusätzlich zu erklären, daß die dissoziierenden Ionen dem wandernden Teilchen Vorzeichen und Stärke der elektrostatischen Ladung geben. Unter diesen Voraussetzungen ist zu

verstehen, daß die kathodische Wanderung eines Teilchens mit zunehmender  $\text{cH}^+$  geringer wird; denn die Wasserstoffionen zwingen zum Austausch und ihresgleichen zur Assoziation, wobei letzteres eine Minderung der Ladung des Teilchens zur Folge hat.

Was weiter interessiert, ist die Tatsache, wie sie in den Abb. 1 und 3 demonstriert ist, daß bei der kataphoretischen Wanderung der Hefezellen die Geschwindigkeiten bei gleicher  $\text{cH}^+$  und gleicher molarer Konzentration der Elektrolyte des Suspensionsmittels ungleich sein können, wenn man die Wanderungen in artverschiedenen Pufferlösungen vergleicht. Die Unterschiede können dabei keine Funktion der Aziditäten und der Konzentrationen sein. In den Versuchen zum Kurvenbild 1 und in den Versuchsteilen zum Kurvenbild 3, wo die Kurvenbereiche bei gleichen  $\text{cH}^+$ -Werten ineinanderreichen, waren bei verhältnismäßig großen Geschwindigkeitsunterschieden die Anionenarten der Puffersäuren und die Kationenkonzentrationen der Puffersalze unterschiedlich. Daß die Anionenart des Puffers einen wesentlichen Einfluß auf die elektrostatistischen Ladungen der Hefezellen haben kann, geht eindeutig aus den Versuchen hervor, die der Abb. 4 zugrunde liegen. In diesem Kurvenbild werden Geschwindigkeiten der kataphoretischen Wanderung von Hefezellen im Schwankungsbereich der  $\text{cH}^+$  von pH 4,7 bis pH 2,5 in drei verschiedenen Puffern verglichen, wobei der Zitronensäure-Natriumzitrat-Puffer nur im Bereich der  $\text{cH}^+$  von pH 3,1 bis pH 2,5 als Vergleichspartner vertreten ist.

Beim Vergleich mit der Abb. 1 läßt sich ermitteln, daß Hefezellen im Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer zwischen pH 6,3 und pH 5,5 Geschwindigkeiten um  $8 \mu/\text{Sekunde}$  haben. Die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung wird also zunächst mit steigender  $\text{cH}^+$  bis etwa pH 4,0 geringer ( $4 \mu/\text{Sekunde}$ ), wie es auf Grund der Wirkung steigender  $\text{cH}^+$ , nämlich wegen der zunehmenden Kationenassoziation und der deswegen verminderten freien Ladung zu erwarten ist. Überraschenderweise erreicht die Minderung der Geschwindigkeit mit steigender  $\text{cH}^+$  in diesem Puffer nicht den Nullwert, sondern steigt im Gebiet der hohen  $\text{cH}^+$  wieder an. Bei den Vergleichspartnern des Versuches, den Hefezellen im Zitronensäure-Natriumzitrat-Puffer und im Oxalsäure-Natriumoxalat-Puffer, war die reguläre Minderung und der Umschlag in die andere Wanderungsrichtung gegeben. Der Unterschied im Verhalten der Hefezellen kann nur auf die Phosphationen im Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer zurückgeführt werden, denn gegenüber der Situation der Hefezellen im Zitronensäure-Natriumzitrat-Puffer war nur das Phosphation des Puffersalzes als Unterschied gegeben. Wie ist aber die Wirkung des Phosphations zu erklären?

Mit zunehmender  $\text{cH}^+$  des Suspensionsmittels müssen die an der Hefe oder in der Hefe adsorbierten (assoziierten) Anionen (Hydroxylionen) dissoziieren, was zum Austausch mit den Anionen der Puffersubstanzen führt. Entstehen Bindungen mit verhältnismäßig starker Dissoziation, dann stehen einer aus der Kationendissoziation gegebenen Menge an positiven Ladungseinheiten eine große Menge negativ geladener Anionen gegenüber. Es kommt zur Ladungsinterferenz, somit zur Minderung der positiven La-

dung oder zum Ausgleich der elektrostatischen Ladungen mit dem Endergebnis Null oder auch zum Überwiegen der negativen Ladungen und damit zur Umkehr der Wanderungsrichtung. Entstehen dagegen durch den Austausch Bindungen mit geringer Dissoziation, dann wird die Menge der aktiven Anionen vermindert, und entsprechend der Menge inaktivierter Anionen wird auch die Ladungsinterferenz geringer, was kationische Ladungen verstärkt zur Wirkung kommen läßt. Ein Fall letzterer Art ist in der Kurve des Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffers des Kurvenbildes 4 demonstriert.

Die akute elektrostatische Ladung eines Ampholyten als Effekt einer Ladungsinterferenz zu sehen, ist auch eine Grundlage für die Erklärung der diskontinuierlichen Ladungsschwankungen. Man muß sich vorstellen, daß die Zelle eine Ansammlung unterschiedlicher Ampholyte ist, die einzeln ihre IEP bei verschiedenen  $\text{cH}^+$  haben. Hat die Lösung in einem gegebenen Fall eine  $\text{cH}^+$ , die größer als der IEP des einen und kleiner als der IEP des anderen Ampholyten ist, dann sind diese im Gemisch zugleich der eine in bezug auf die Adsorptionsladung anionisch, der andere kationisch geladen. Das Vorzeichen und die Größe der Ladung des Ganzen ergeben sich aus dem, was aus der Interferenz resultiert<sup>1</sup>. Dasselbe ist zu erwarten, wenn mehr als zwei Ampholyte mit unterschiedlichen IEP im Gemisch vertreten sind. Immer wird sich beim einzelnen Ampholyten das Vorzeichen der Ladung, ob kationisch oder anionisch, und die Stärke der Ladung aus der Interferenz der kationischen und anionischen Ladungen ergeben, die von den Dissoziationskonstanten der beiden Elektrolytcharaktere und den Konzentrationen der entsprechenden Ionen in der Lösung beherrscht werden.

Für das Gemisch verschiedener Ampholyte ist eine Interferenz der Summe aller kationischen und der Summe aller anionischen Ladungen zu erwarten. Und wenn dabei im Durchschnitt aller Fälle die Dissoziation der adsorbierten Anionen nur um wenig geringer ist als die Dissoziation der adsorbierten Kationen, dann ergeben sich aus den Summierungen und der Interferenz der summierten Ladungen für das Ganze (Zelle) kontinuierliche kationische Ladungen bis weit in die Bereiche hoher  $\text{cH}^+$  hinein. Solche konsequenten Ladungen, wie sie Kölb el (1947) und D r a w e r t (1951) beobachtet haben und wie ich sie auch selbst mit Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern bis in Bereiche hoher  $\text{cH}^+$  feststellen konnte, sind nur qualitativ, d. h. bezüglich ihres Vorzeichens kontinuierlich. Bezüglich der Ladungsstärke können sie diskontinuierlich sein, d. h. es kann bei gleichbleibendem Vorzeichen der Ladung mit der Änderung der  $\text{cH}^+$  die Ladungsstärke schwanken. Was dann jeweils bei einer bestimmten  $\text{cH}^+$  möglich ist, muß davon abhängig sein, in welchem Mengenverhältnis sich dort die Summen der kationischen und anionischen Ladungen gegenüberstehen. Dieses

<sup>1</sup> Bateman (Höber, Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe, Bern 1947, p. 151) gebrauchte unter ähnlichen Umständen den Ausdruck „Überlappung der Dissoziationskonstanten“.



Mengenverhältnis ist aber, wie hier gezeigt wurde, nicht allein vom Adsorbens und der  $\text{cH}^+$ , d. h. von den Dissoziationskonstanten der  $\text{H}^+$ - und  $\text{OH}^-$ -Bindungen des Adsorbens, sondern auch von der molaren Konzentration der Lösung und von der Dissoziation (Dissoziationskonstanten) der Bindung abhängig, die das Adsorbens mit den eingetauschten Ionen eingeht.

Es wurde hier gezeigt, wie die kationische Ladung der Hefezellen, die bis in hohe  $\text{cH}^+$  festzustellen ist, in allen Bereichen der  $\text{cH}^+$  starken Schwankungen unterworfen ist, daß sie aber in der Regel mit steigender  $\text{cH}^+$  durchschnittlich abnimmt. Ob und bei welcher  $\text{cH}^+$  sie den Nullwert erreicht, ist von der Art der eingetauschten Anionen abhängig. Beim Nullwert wechselt die Ladung das Vorzeichen und kann in anionischen Werten ansteigen. Wegen der diskontinuierlichen Schwankungen, deren Ursachen oben beschrieben wurden, wechselt die Ladung nicht nur einmal vom kationischen Vorzeichen zum anionischen Vorzeichen, sondern kann wiederholt vom anionischen ins kationische zurückgehen und erneut vom kationischen ins anionische wechseln.

Kölbel (1947) und Drawert (1951) haben die kataphoretischen Wanderungen lebender und toter Hefezellen verglichen, dabei aber nur die Wanderungsrichtungen beachtet. Bei eigenen Untersuchungen (A. Wartenberg 1956) konnte festgestellt werden, daß die tote Hefezelle in einem Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffer bei steigenden  $\text{cH}^+$ -Werten ihre kataphoretische Wanderungsrichtung zwischen pH 3,5 und pH 2,5 von kathodisch nach anodisch ändert, wobei entsprechend der diskontinuierlichen Schwankungen des Ladungsverlaufes der Wechsel mehrmals zu beobachten war. Kölbel (1947) stellte dagegen bei der toten Hefezelle keinerlei Ladungswechsel fest; erst in einer weiteren Mitteilung berichtet er einen Ladungswechsel der toten Hefe bei pH 2,6 bzw. pH 2,9. Hingegen ergaben die Versuche von Drawert (1951) einen Ladungswechsel bei pH 4,5. Nimmt man an, daß die Autoren verschiedene Pufferlösungen in verschiedenen Konzentrationen angewandt haben, so wird dieser Widerspruch in den Versuchsergebnissen verständlich.

Es war im Sinne der vorliegenden Abhandlung interessant zu wissen, wie sich lebende und tote Hefezellen bezüglich der Geschwindigkeit ihrer kataphoretischen Wanderungen unterschiedlich verhalten. Der erste diesbezügliche Versuch wurde mit lebenden und toten Hefezellen in Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern (0,1 mol) angestellt. Sein Ergebnis ist in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt eindeutig, daß die diskontinuierlichen Schwankungen, wie sie von den Ladungsinterferenzen verschiedener Ampholyte herrühren müssen, auch hier erscheinen, und zwar weitgehend parallel auftreten. Ob die durchschnittlich stärkeren Ladungen auf den Zerfall elektroneutraler Eiweiß-Lipoid-Komplexe zurückzuführen sind, wie es von Drawert (1951) angenommen wurde, kann aus dem Versuch heraus nicht beurteilt werden. Ebenso kann die Erscheinung, daß die Parallele der Schwankungen im  $\text{cH}^+$ -Bereich zwischen pH 4,6 und pH 5,6 fehlt, zunächst nicht eindeutig erklärt werden, wenn auch die Annahme naheliegt, daß



durch die Hitzeinwirkung nur ein oder wenige Ampholyte denaturiert, also chemisch verändert werden. Wenn man andererseits bedenkt, welche Bedeutung die Art der Abtötung der Hefezellen für ihr kataphoretisches

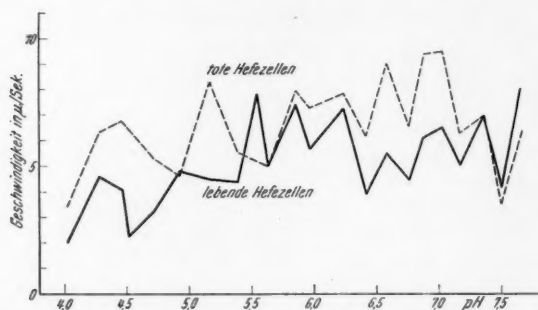


Abb. 5. Kataphoretische Wanderungsgeschwindigkeit lebender (—) und toter (----) Hefezellen in 0,1 mol Zitronensäure-Natriumphosphat-Puffern.

#### Lebende Hefe

pH 4,03	M = 2,08 ± 0,344 µ/Sek.
pH 4,28	M = 4,53 ± 0,188 µ/Sek.
pH 4,46	M = 4,04 ± 0,109 µ/Sek.
pH 4,51	M = 2,23 ± 0,325 µ/Sek.
pH 4,72	M = 3,19 ± 0,101 µ/Sek.
pH 4,93	M = 4,79 ± 0,149 µ/Sek.
pH 5,17	M = 4,45 ± 0,164 µ/Sek.
pH 5,39	M = 4,35 ± 0,097 µ/Sek.
pH 5,55	M = 7,79 ± 0,163 µ/Sek.
pH 5,63	M = 5,01 ± 0,172 µ/Sek.
pH 5,86	M = 7,38 ± 0,145 µ/Sek.
pH 5,97	M = 5,65 ± 0,126 µ/Sek.
pH 6,24	M = 7,21 ± 0,133 µ/Sek.
pH 6,42	M = 3,93 ± 0,098 µ/Sek.
pH 6,58	M = 5,49 ± 0,136 µ/Sek.
pH 6,76	M = 4,44 ± 0,091 µ/Sek.
pH 6,88	M = 6,06 ± 0,097 µ/Sek.
pH 7,03	M = 6,48 ± 0,124 µ/Sek.
pH 7,17	M = 5,04 ± 0,136 µ/Sek.
pH 7,36	M = 6,93 ± 0,205 µ/Sek.
pH 7,50	M = 4,15 ± 0,132 µ/Sek.
pH 7,66	M = 8,00 ± 0,188 µ/Sek.

n = 25

#### Tote Hefe

pH 4,03	M = 5,49 ± 0,211 µ/Sek.
pH 4,28	M = 6,24 ± 0,194 µ/Sek.
pH 4,46	M = 6,72 ± 0,151 µ/Sek.
pH 4,72	M = 5,29 ± 0,247 µ/Sek.
pH 4,93	M = 4,58 ± 0,119 µ/Sek.
pH 5,17	M = 8,25 ± 0,147 µ/Sek.
pH 5,39	M = 5,55 ± 0,109 µ/Sek.
pH 5,63	M = 5,03 ± 0,134 µ/Sek.
pH 5,86	M = 7,93 ± 0,126 µ/Sek.
pH 5,97	M = 7,27 ± 0,146 µ/Sek.
pH 6,24	M = 7,81 ± 0,141 µ/Sek.
pH 6,42	M = 6,18 ± 0,112 µ/Sek.
pH 6,58	M = 9,05 ± 0,186 µ/Sek.
pH 6,76	M = 6,53 ± 0,150 µ/Sek.
pH 6,88	M = 9,36 ± 0,233 µ/Sek.
pH 7,03	M = 9,42 ± 0,202 µ/Sek.
pH 7,17	M = 6,26 ± 0,080 µ/Sek.
pH 7,36	M = 6,95 ± 0,182 µ/Sek.
pH 7,50	M = 5,46 ± 0,125 µ/Sek.
pH 7,66	M = 6,50 ± 0,089 µ/Sek.

n = 25

Verhalten haben kann (vgl. A. Wartenberg 1956, Tab. 2), dann wird einem klar, daß die Desorganisation des Zellgefüges mit Letaleffekt zu Zuständen führt, die nicht sehr leicht mit dem Zustand lebender Zellen zu vergleichen sind. Es wird zunächst noch viel Arbeit aufzuwenden sein, um die Kenntnisse über die Zustandsgrößen des lebenden Adsorbens 'Zelle' zu erweitern, bevor man etwas für die Erforschung der Änderungen tun

kann, die im Falle des Absterbens eintreten. Ob dabei einige Ampholyte unverändert bleiben und andere wesentliche Veränderungen erleiden, darf endgültig erst nach künftigen Forschungen in Erwägung gezogen werden.

### Besprechung der Ergebnisse

Es sind die Bedingungen ermittelt worden, unter denen die Geschwindigkeit der kataphoretischen Wanderung der Hefezellen sich ändert. Sie nimmt mit zunehmender molarer Konzentration im Lösungsmittel ab und nähert sich dem Wert Null. Bei gleicher molarer Konzentration wird die Geschwindigkeit der kataphoretischen Wanderung von Hefezellen mit zunehmender  $cH^+$  geringer. Hierbei nähert sich die Änderung aber nicht einem Endwert, sondern einem Wechsel in die Wanderungsrichtung mit umgekehrtem Vorzeichen. Mit dem Richtungswechsel wird aus der kathodischen Wanderung eine anodische.

Bei der Beurteilung des Richtungswechsels stößt man auf zwei Schwierigkeiten. Erstens erfolgt er bei minimalen Geschwindigkeiten. Man kann nicht aus der Erfahrung heraus sagen, er erfolge beim Nullwert der Geschwindigkeit, denn der Nullwert ist ein errechenbarer, aber kein wahrnehmbarer Wert. Andererseits ist er nur mit verhältnismäßig großen Fehlern errechenbar, denn der Richtungswechsel der einzelnen Zellen erfolgt ohne Ruhe unmittelbar. In einer Suspension von Hefezellen tritt der Richtungswechsel nicht bei allen Zellen gleichmäßig, sondern mit einer mehr oder weniger großen Schwankung der Häufigkeit ein. Am mittleren Wendepunkt der  $cH^+$ -Reihe bewegt sich ein Teil der Zellen noch in der Richtung kathodischer Wanderung, während sich ein anderer Teil schon anodisch bewegt. Erst dann, wenn man in der  $cH^+$ -Reihe weiterrückt, bewegen sich alle Zellen gemeinsam in der entgegengesetzten Richtung.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Hefezellen in einem Puffer, das Abnehmen der Wanderungsgeschwindigkeit mit zunehmender  $cH^+$  und der Richtungswechsel der Wanderung werden sehr stark vom Charakter des Anions der Puffersäure und des Puffersalzes beherrscht. Dabei hat die Änderung der Geschwindigkeit keinen kontinuierlichen Verlauf, sondern zeigt starke Schwankungen, deren Exzesse über bestimmten Werten verschiedener  $cH^+$ -Bereiche vermehrte oder verminderte Geschwindigkeiten ergeben. Die Exzesse erscheinen in bestimmten  $cH^+$ -Bereichen, und zwar unabhängig davon, ob das Anion des Puffers eine große oder mindere durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeit in allen Bereichen der  $cH^+$  bewirkt. Sie sind Merkmale der Zelle und werden nur insofern von dem Suspensionsmittel beeinflusst, als unter Aziditäts-, Molaritäts- und Anionenbedingungen, die durchschnittlich eine große Wanderungsgeschwindigkeit bewirken, die Reichweiten der Exzesse größer sind als unter Bedingungen, die durchschnittlich geringere Wanderungsgeschwindigkeiten zur Folge haben. Sie sind in letzterem Falle aber doch so weit wirksam, daß sie im Bereich minimaler Wanderungsgeschwindigkeit den akuten Richtungssinn der Wanderung mehrmals von der kathodischen zur anodischen Wanderung und zurück wechseln lassen.

Die Tatsache, daß die diskontinuierlichen Schwankungen der Wanderungsgeschwindigkeit auch den Richtungssinn vom kathodischen zum anodischen und zurück ändern können, erlaubt Rückschlüsse über die Natur ihrer Verursachung. Es ist anzunehmen, daß bei jeder  $\text{cH}^+$  die Ladung der Zelle, die den Richtungssinn und die Geschwindigkeit ihrer kataphoretischen Wanderung mitbestimmt, die Resultante aus den akuten Ladungen einer unbekannten Anzahl Ampholyte ist, die sich durch unterschiedliche IEP und Dissoziationskonstanten der kationischen und anionischen Komponenten unterscheiden.

Die akute Ladung eines einzelnen Ampholyten resultiert aus der Interferenz der positiven und negativen Ladungen, die infolge der Dissoziation seiner adsorbierten Kationen und Anionen gegeben sind. Der IEP ist als totale Interferenz der Ladung zu beurteilen. Die Ladungsinterferenz ist bei einer anderen  $\text{cH}^+$  nicht total. Abweichend von der  $\text{cH}^+$  des IEP resultiert bei relativ hoher  $\text{cH}^+$  des Lösungsmittels die Tendenz einer anodischen Wanderung des suspendierten Teilchens, also einer positiven Eigenladung des Ampholyten, und umgekehrt resultiert bei relativ geringer  $\text{cH}^+$  des Lösungsmittels die Tendenz einer kathodischen Wanderung, also einer negativen Eigenladung des Ampholyten, denn das suspendierte Teilchen, wie auch die Zelle, wandert nicht mit der Ladung des Adsorbens, sondern mit der Ladung des Adsorbats.

Aus gegebenen Kationen- und Anionenbindungen und aus deren aktivierenden Dissoziationen und inaktivierenden Assoziationen resultiert also durch die Interferenz der Ladungen eines Ampholyten eine Löschung entgegengerichteter Ladungen. Es bleibt ein Rest freier, d. h. in der Kataphorese wirksamer Ladungen, der das aktuelle Adsorptionspotential des einzelnen Ampholyten genannt werden kann.

Die Hefezellen sowie die Pflanzenzellen allgemein sind aber nicht wie einzelne Ampholyte zu verstehen. Der Zellinhalt, als Adsorptionssystem betrachtet, ist das Gemisch einer unbekannten Anzahl azidoider, basoider und amphoterer Körper, die in Bindungen mit Wasserstoffionen und Hydroxylionen einzeln ihre spezifische Dissoziationskonstanten und auch ihre IEP haben. Mit jedem Kationen- bzw. Anionenaustausch, der mit den Elektrolyten der Lösung möglich ist, entstehen andere Bindungen mit anderen Dissoziationskonstanten. Was im Assoziations- und Dissoziationsspiel von Adsorbens und Adsorbat geschieht, ist eine Funktion, deren Faktoren in den Charakteren des Adsorbens, Adsorbats und der freien Ionen in der Lösung zu suchen sind. Dabei ist zu erwarten, daß unter einer gegebenen Bedingung, d. h. bei einer bestimmten  $\text{cH}^+$  der Lösung, der eine Ampholyt mehr als Säure und ein anderer mehr mit seinem Basenanteil dissoziiert. Man könnte hier von einer Überlappung der Kationen- und Anionendissoziation sprechen. Besser ist es, die Wirkung herauszustellen und auch hier von einer Interferenz entgegengesetzter Ladungen zu sprechen, denn die Wirkungen entgegengerichteter Ladungen verschiedener Ampholyte und auch Azidoide und Basisoide werden sich wie entgegengerichtete Amplituden gleicher Wellen löschen. Ebenso ist zu erwarten, daß die akuten IEP

und Dissoziationskonstanten mehrerer Ampholyte und die Dissoziationskonstanten auch der anderen nicht amphoteren Adsorptionsbindungen sich nahe liegen können. Es werden dann nicht entgegengerichtete Dissoziationen und Ladungen überlappen und sich interferierend löschen, sondern es werden sich dabei mehr die gleichgerichteten Ladungen überdecken und häufen, und es wird aus der Interferenz eine größere Ladung resultieren, die sich aus der Summe der Ladungen gleichen Vorzeichens ergibt, wie sich die gleichgerichteten Amplituden gleicher Wellen zu einer größeren Amplitude, zu einer größeren Energiedichte summieren können.

Was demnach eine Zelle oder eine Zellenart im Kataphoreseversuch demonstriert, resultiert aus der Interferenz der Adsorptionsladungen aller Ampholyte, Azidoide und Basoide. Es ist ein Rest dissoziierender und austauschbarer Ionen, der durch die Interferenz nicht gelöscht wird. Dieser Rest kann das aktuelle Adsorptionspotential der ganzen Zelle genannt werden. Die Wanderungsrichtung ist also das Umgekehrte des Ladungssinnes der Zellampholyte.

Die Wanderungsgeschwindigkeit im gegebenen Spannungsfeld steht in einem Größenverhältnis zur Ladungsstärke der Zelle. Das Größenverhältnis selbst ist noch unbekannt. Es wird auch mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen nicht genau zu ermitteln sein, denn hierbei ist mit vielen Fehlerquellen zu rechnen. Vor allem hat man es bei den dissoziierenden Ionen, die die Zelle im Spannungsfeld „mitnehmen“, nicht immer mit Wasserstoff- und Hydroxylionen oder gleichbleibend mit anderen Kationen oder Anionen zu tun, die als freie Ionen im gleichen Spannungsfeld alle die gleiche Geschwindigkeit haben müssen, sondern deren Geschwindigkeiten artgemäß verschieden sind.

Was die Wanderungsgeschwindigkeiten beeinflussen kann, läßt sich sehr eindrucksvoll demonstrieren. Mit steigender  $\text{cH}^+$  schwindet die Bedeutung der sonst vorherrschenden Kationendissoziation, und die kathodische Wanderung wird geringer, weil infolge von Austausch und Assoziation der Kationen die anionischen Ladungen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Man kann aber die  $\text{cH}^+$  einer Lösung nicht erhöhen, ohne mit einer notwendig zuzufügenden Säure neben dem  $\text{H}^+$ -Ion auch ein Anion hinzubringen. Die Anionen finden leicht die Austauschmöglichkeit, weil in der sauren Lösung die Hydroxylionen ohnehin stark dissoziieren. Was dabei geschieht, scheint zunächst fast unwahrscheinlich zu sein. Meist wird die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung infolge erhöhter Kationenassoziation geringer, wie es als Wirkung erhöhter  $\text{cH}^+$  theoretisch zu erwarten ist. Es ist aber auch möglich, daß die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung mit steigender  $\text{cH}^+$  größer wird, was — wie gesagt — sinnlos widersprechend zu sein scheint. Der Widerspruch entfällt sofort, wenn man bedenkt, daß das Adsorptionspotential der Zelle, von dem die Wanderungsgeschwindigkeit der Zelle abhängt, eine Funktion der Interferenz einander entgegengesetzter Ladungen ist. Es kann also sein, daß das Hinzufügen einer Säure unter der Wirkung der Wasserstoffionen die Dissoziation der Kationen vermindert. Der Effekt der Interferenz kann aber auch umgekehrt

sein, wenn das unvermeidliche Anion der Säure im Austausch eine Bindung mit sehr geringer Dissoziation eingeht. Die Anionendissoziation kann dann trotz der Erhöhung der  $\text{cH}^+$  weit mehr zurückgehen als die Kationendissoziation. Wird von einem gegebenen Verhältnis aus die Dissoziation der Anionen stärker vermindert als die Dissoziation der Kationen, dann steigt notwendigerweise die kationische Ladungsdichte. Es werden mehr Kationen aus der Wirkung der Interferenz, aus der Ladungslöschung befreit, als durch die erhöhte  $\text{cH}^+$  in den Zwang zur Assoziation kommen.

Das Anion kann je nach der Auswahl des Puffers über einen weiten Bereich der  $\text{cH}^+$  eine verhältnismäßig große oder eine verhältnismäßig geringe durchschnittliche Geschwindigkeit der kataphoretischen Wanderung verursachen. Es kann auch die kathodische Wanderung mit steigender  $\text{cH}^+$  beschleunigen, wenn unter Beachtung gleichbleibender molarer Konzentration die höhere  $\text{cH}^+$  mit einer Säure erzielt wird, deren Anionen im Austausch gegen Hydroxylionen eine nichtdissoziierende Bindung eingehen. Der Anioneneffekt ist dabei sehr groß. Er überdeckt weit die oben beschriebenen möglichen Fehler, die aus der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen resultieren können.

Ein dritter Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit und (im Wendebereich) auf den Richtungssinn der Wanderung geht von der Zelle aus. Es sind die Exzesse der diskontinuierlichen Schwankungen in der Geschwindigkeit. Sie scheinen bei allen Puffern und allen von den Anionen beherrschten durchschnittlichen Geschwindigkeiten wohl mit mehr oder minder großen Reichweiten, aber immer über den gleichen  $\text{cH}^+$ -Werten aufzutreten.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß man die Exzesse der diskontinuierlichen Schwankungen wegen ihrer Regelmäßigkeit Ausdrücke von Zellmerkmalen nennen kann. Ihre Erklärung findet sich im Wesen der Ladungsinterferenz. Zunächst ist zu bedenken, daß jeder Ampholyt über der  $\text{cH}^+$ -Reihe zwei Maxima und drei Minima des Adsorptionspotentials hat: ein Maximum des negativen und ein Maximum des positiven Potentials, ein Minimum des negativen Potentials infolge des Assoziationszwanges im Bereich höherer  $\text{cH}^+$ , ein Minimum des Gesamtpotentials beim IEP und ein Minimum des positiven Potentials infolge des Assoziationszwanges im Bereich minderer  $\text{cH}^+$ . In einem Gemisch solcher Ampholyte ist es nun möglich, daß die individuellen IEP der Ampholyte ungleich weit auseinanderliegen und daß die Ampholyte sowohl in den Amplituden als auch in den Halbwellenlängen in sich und untereinander ungleich sind. Trägt man die Potentialkurven einer Anzahl Ampholyte modellmäßig in ein Koordinatensystem ein (Geschwindigkeits- oder Potentialwerte in der Ordinate und  $\text{cH}^+$ -Werte in der Abszisse), berechnet über den Streckenpunkten der Abszisse die aus der Interferenz resultierenden Potentialwerte des Ganzen und trägt deren Potentialkurve ein, dann können sich tatsächlich die diskontinuierlichen Schwankungen zeigen, wie sie bei den Geschwindigkeitsmessungen der Kataphoreseversuche charakteristisch sind. Daß die Exzesse der diskontinuierlichen Ladungs- oder Potentialschwankungen unabhängig von dem jeweils akuten Adsorptionspotential immer über den gleichen Werten

der  $\text{cH}^+$  auftauchen und die verschiedenen Kationen und besonders die Anionen auf die Lage der Exzesse keinen Einfluß haben, wird dann verständlich, wenn man erwägt, daß bei einem Ampholyten vom IEP ausgehend im Bereich höherer  $\text{cH}^+$  die Wasserstoffionen die stärkst assoziierenden Kationen sind, die die anderen Kationen aus der Assoziation bzw. Adsorption verdrängen. Der Säureanteil des Ampholyten ist dann stark assoziiert; umgekehrt verdrängen im Bereich verminderter  $\text{cH}^+$  die Hydroxylionen die anderen Anionen aus der Assoziation und assoziieren selber. In dem komplexen Ampholyt 'Zelle' existieren jedoch auf Grund der unterschiedlichen Lage der IEP der verschiedenen Einzelampholyte immer entgegengerichtete individuelle Adsorptionspotentiale, die sich interferierend löschen oder verstärken können. Inwieweit man jedoch von den steilen Anstiegen des Adsorptionspotentials bzw. der kataphoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, die theoretisch immer dort auftreten müssen, wo ein einzelner Ampholyt mit fallenden  $\text{cH}^+$ -Werten beim Durchgang durch den IEP die totale Wasserstoffionenassoziation aufgibt und in eine totale Hydroxylionenassoziation übergeht, direkt auf die IEP verschiedener Zellampholyte schließen darf, steht zunächst noch nicht fest. Es werden weitere eingehendere Untersuchungen hierüber durchgeführt werden müssen.

Was hier bei den beschriebenen Arbeiten über Richtung und Geschwindigkeit der kataphoretischen Wanderung mit dem Ziele der Darstellung des physiologischen Adsorptionspotentials getan und erreicht werden konnte, sind nur Vorarbeiten, die sich zunächst mit bekannten Dingen auseinandersetzen mußten und für den Weg ins Unbekannte orientierende Aufgaben hatten.

### Zusammenfassung

Die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung von Hefezellen im Kataphoreseversuch wird mit steigender molarer Konzentration des verwendeten Puffers geringer. Ihre Verringerung nähert sich asymptotisch dem Nullwert.

Die Geschwindigkeit wird auch mit steigender  $\text{cH}^+$  geringer und erreicht bei höherer  $\text{cH}^+$  einen Minimalwert, nähert sich aber nicht einem Nullwert, sondern einem Wendepunkt der Wanderungsrichtung. Wird dieser erreicht, dann tritt mit weiterer Erhöhung der  $\text{cH}^+$  anodische Wanderung mit steigender Geschwindigkeit auf.

Die Geschwindigkeit steht sehr stark unter spezifischen Einflüssen der Anionencharaktere der verwendeten Puffer. Das Phosphation erhöht trotz steigender  $\text{cH}^+$  die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung. Bei der Anwendung anderer Anionen, wie z. B. des Oxalations, vermindert sich die Geschwindigkeit der kathodischen Wanderung mit steigender  $\text{cH}^+$ .

Die Kurve der Geschwindigkeitsänderung der kataphoretischen Wanderung über der  $\text{cH}^+$ -Reihe zeigt eine Änderung in der Dissoziation der adsorbierten Ionen und mit entgegengesetztem Vorzeichen eine Änderung der elektrostatischen Ladungen der Zellampholyte. Diese Änderung ist nicht kontinuierlich, sondern hat starke diskontinuierliche Schwankungen mit



Exzessen, die immer wieder in bestimmten Wertgebieten der  $\text{cH}^+$ -Reihe auftreten. Es muß angenommen werden, daß die Schwankungen auf Einflüsse der IEP und Dissoziationskonstanten verschiedener Ampholyte, Azidoide und Basoide der Hefezellen zurückzuführen sind.

#### Literatur

- Drawert, H., 1951: Zur Frage der Bestimmung des isoelektrischen Punktes von lebendem Plasma. *Z. Naturforsch.* 6 b, 141.
- Kölbel, H., 1947: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Acridinorange in lebenden und toten Pflanzenzellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. *Z. Naturforsch.* 2 b, 382.
- Stearn, A. E., and E. W. Stearn, 1951: Metathetic equilibria of bacterial systems with special reference to bacteriostasis and bacterial flocculation. *Protoplasma* 12, 580.
- Wartenberg, A., 1956: Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. I. Die Wanderungsrichtung in der Kataphorese. *Protoplasma* (im Druck).



## Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*

Von

**Davor Miličić**

Aus dem Botanischen Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät Zagreb

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. März 1956)

Schon lange ist die interessante Fähigkeit vieler Viren bekannt, daß sie in den Zellen ihrer Wirtspflanzen die Bildung besonderer Körper verursachen können. Diese Zelleinschlüsse können verschiedener Art sein: amorph oder kristallinisch. Die amorphen Körper oder X-bodies sind häufiger als die kristallinen Einschlüsse und für die an Virose leidenden Pflanzen besonders charakteristisch. Nach B a w d e n (1950) erscheinen ähnliche Körper bei keiner anderen Krankheit, sondern nur bei Viruskrankheiten. Sie haben gewöhnlich eine kugelige, ovale oder amöboide Form, besitzen einen körnigen Inhalt und sehr oft eine oder mehrere Vakuolen.

Neben den amorphen erscheinen manchmal in den infizierten Pflanzen auch kristalline Einschlüsse. Vielen Viren fehlt die Fähigkeit, die letzteren Körper zu verursachen. K ö h l e r und K l i n k o w s k i (1954) und B a w d e n (1950) führen folgende Viren an, die kristalline Einschlüsse bilden können: Tabakmosaik-Virus, Etch- und Ringfleckigkeit-Virus des Tabaks, Hafermosaik-Virus, Pisum-2- und Phaseolus-2-Virus und Kartoffel-X-Virus (das letztere nicht regelmäßig)<sup>1</sup>; weiter ist diesen Viren das Kakteenvirus anzuschließen, das von R o s e n z o p f (1951) entdeckt und später eingehender besonders von W e b e r und seinen Mitarbeitern untersucht wurde (Lit. bei A m e l u n x e n 1956). Die bekanntesten kristallinen Einschlüsse sind diejenigen, die unter dem Einfluß des Tabakmosaik-Virus entstehen; diese haben am häufigsten die Form hexagonaler Plättchen, die dreidimensionale Regelmäßigkeit echter Kristalle zeigen. In letzterer Zeit haben S t e e r e und W i l l i a m s (1953) mittels des Mikromanipulators diese Eiweißkristalle isoliert und elektronenoptisch nachgewiesen, daß sie aus Partikeln von Tabak-

<sup>1</sup> Bei K ö h l e r und K l i n k o w s k i finden sich Angaben über noch einige kristallinen Einschlüsse, die zum Unterschied von den oben angeführten nicht so eingehend untersucht worden sind.

mosaik-Virus aufgebaut sind. Diese Entdeckung hat das Interesse für die Viruseinschlüsse vergrößert, denn es ist sehr wahrscheinlich, daß auch manche andere kristalline Viruskörper Aggregate von Virusmakromolekeln darstellen.

Die im Cytoplasma lokalisierten kristallinen Einschlüsse entstehen in vielen Fällen aus den X-Körpern. Da die von verschiedenen Viren bedingten Kristalle eine verschiedenartige Form und Lokalisation zeigen, so können



Abb. 1. *Alliaria officinalis*. Teil einer Pflanze mit Krankheitssymptomen.

diese neben anderen Eigenschaften einen großen Wert für die Diagnostik der Viruserkrankungen haben.

Soweit uns bekannt ist, sind bis jetzt bei keiner Cruciferen-Virose kristallinische Viruskörper beobachtet worden. Es ist deshalb von Interesse zu berichten, daß wir in kranken Exemplaren von *Alliaria officinalis* amorphe und kristallinische Viruseinschlüsse beobachtet haben.

Im vorigen Jahre haben wir an den Wegrändern neben den Dörfern Gračani und Šestine in der Umgebung von Zagreb viele kranke Exemplare von *A. officinalis* gefunden. Ungefähr 20 bis 30% aller Pflanzen wiesen deutliche Krankheitssymptome auf. An den Blättern dieser Pflanzen konnte man gelbliche und gelbgrüne Flecken verschiedener Form wahrnehmen, die sehr jenen von virusmosaikkranken Blättern ähnelten. Außerdem waren die Blattspalten sehr stark gerunzelt und ihre Ränder nach unten oder nach oben gekrümmt (Abb. 1 und 2). Durch diese Krümmung bekam die Blattspalte die Form einer seichten Schüssel, deren gewölbter Teil bald nach oben, bald nach unten gekehrt war. Dieses Aussehen des Blattes resul-

tierte sehr wahrscheinlich daraus, daß das Flächenwachstum der Spreite stärker als das des Randes war.

Diese pathologischen Veränderungen sind ziemlich charakteristisch für manche Viruskrankheiten. Da wir außerdem in den Zellen der kranken Pflanzen auch X-Körper gefunden haben, sind wir der Ansicht, daß die anomalen Exemplare von *A. officinalis* an einer Virose leiden. Im Zusammenhang damit muß erwähnt werden, daß in den Handbüchern von Köh-

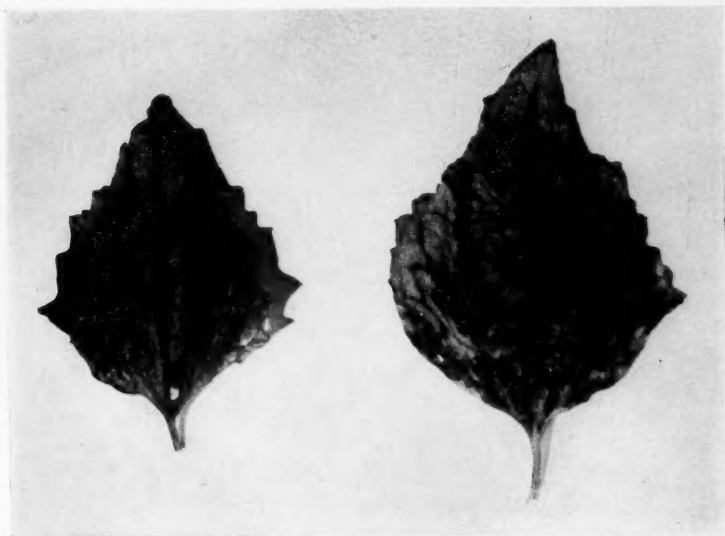


Abb. 2. *Alliaria officinalis*. Zwei Blätter einer kranken Pflanze.

ler und Klinkowski (1954), Rižkov (1946) und Smith (1937) keine Virose für *Alliaria officinalis* angeführt ist; es scheint demnach, daß in der vorliegenden Mitteilung eine solche Krankheit zum erstenmal verzeichnet wird.

### X-Körper und Kristallnadeln

In den Zellen kranker Pflanzen von *Alliaria officinalis* haben wir kugelige oder irreguläre, manchmal vakuolisierte Cytoplasma-Ballen gefunden, die durchaus mit X-Körpern viruskranker Pflanzen übereinstimmen. Daß diese Gebilde mit pathologischen Veränderungen im Zusammenhang stehen, dafür spricht der Umstand, daß sie nur in kranken Exemplaren vorkommen.

Neben den amorphen Körpern begegneten wir auch scharf vom Cytoplasma abgetrennten Einschlüssen, die mit einer kleineren oder größeren Anzahl von Kristallnadeln ausgefüllt waren (Abb. 3 a, b, d). Die Nadeln zeigten eine deutliche Tendenz, sich zueinander parallel einzustellen, und es bildeten sich häufig aus parallel gelagerten Nadeln zusammengesetzte

Bündel. Es fanden sich manchmal in einem Körper mehrere Bündel, die in verschiedenen Richtungen orientiert waren (Abb. 3 a, b). In den X-Körpern

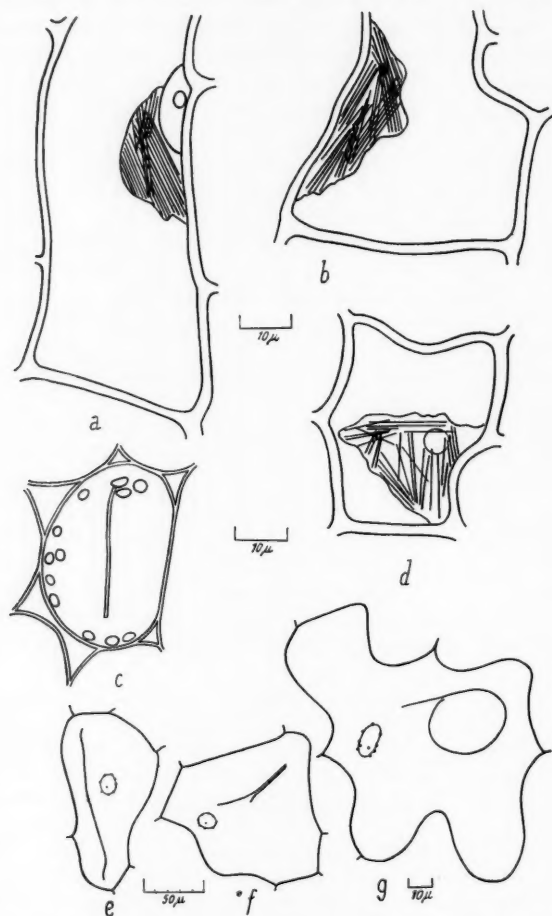


Abb. 3. *Alliaria officinalis*. Zellen mit Viruskörpern. a—b mit Eiweißnadeln ausgefüllte X-Körper in der Epidermis des Fruchtknotens; c stabförmiger Körper aus einer Blatt-Mesophyllzelle; d X-Körper mit Eiweißnadeln und einer Vakuole; e—g fadenförmige Körper in Epidermiszellen des Blattes. — c, e—g nach Fixierung im Sublimat-Alkohol und nach Färbung mit Säurefuchsin gezeichnet.

mit Eiweißnadeln konnte man manchmal auch Vakuolen wahrnehmen (Abb. 3 d).

Die X-Körper von *Alliaria officinalis* stimmten nach ihren Eigenschaften besonders mit jenen X-Körpern überein, die mit der Bildung kristalliner

Einschlüsse im Zusammenhang stehen, so z. B. mit den X-Körpern von Tabakmosaik- oder Kakteen-Virus. Bei diesen letzteren Viren entstehen oft die kristallinen Einschlüsse aus den X-Körpern, und zwar durch eine allmähliche Anhäufung von kristallinem Material. Während sich die X-Körper bei Kakteen und der Tabakmosaikkrankheit relativ selten in solchen Stadien befinden, wenn sie mit Kristallen ganz ausgefüllt sind, ist dieser Zustand bei *Alliaria* ziemlich häufig. Neben solchen X-Körpern bestehen aber in dieser Pflanze auch andere mit stark hervortretender paralleler Anordnung der Eiweißnadeln und undeutlicher Abgrenzung zwischen dem Cytoplasma und der Körper-Grundsubstanz. Diese letzteren Gebilde sind ihrem Aussehen nach den Eiweißspindeln analog.

Die Nadelbündel in X-Körpern sind optisch anisotrop und zeigen in bezug auf die Nadellänge den positiven Charakter der Doppelbrechung. Denselben optischen Charakter haben auch die Kakteen-Eiweißspindeln (Küster 1934) und die Parakristalle der Tabakmosaikkrankheit (Kassanis und Sheffield 1941).

Die Nadelbündel von *A. officinalis* konnten nach der Methode behandelt werden, die von Zimmermann (Molisch 1913) für die Untersuchung der Eiweißkristalloide ausgearbeitet wurde (Fixierung im Sublimat-Alkohol und Färbung mit Säurefuchsin). Die nach diesem Verfahren behandelten Nadeln werden intensiv rot gefärbt. Daß sie aus Eiweiß bestehen, wurde durch das positive Ergebnis der Xanthoprotein-, der Millon- und Raspail-Reaktion nachgewiesen. Die X-Körper und Kristallnadeln lösten sich außerdem leicht in Trypsin.

Was die Lokalisation der X-Körper und der Eiweißspindeln in den kranken Pflanzen betrifft, fanden wir diese in beiden Blattepidermen sowie im Blattmesophyll und in der Epidermis des Fruchtknotens. Die Anwesenheit der Körper in diesen Geweben war ziemlich ungleichmäßig. Manchmal befanden sich die Körper sehr reichlich in der Fruchtknotenepidermis, waren aber sehr selten oder fehlten durchaus in den Blättern; ein anderes Mal waren die Körper im größeren Maß in Mesophyllzellen vorhanden.

#### Andere Eiweißkörper

In denselben Exemplaren von *A. officinalis* kommen neben den X-Körpern und Eiweißspindeln auch faden- und stabförmige Einschlüsse vor. Am häufigsten befanden sich die Stab- und Fadenkörper in Blatt-Mesophyllzellen, wurden aber manchmal auch in der Blattepidermis und im Fruchtknoten bemerkt (Abb. 3 c, e—g). Ähnliche fadenförmige Gebilde sind bisher mehrmals in mit Virus infizierten Pflanzen gefunden worden, so z. B. bei der Tabakmosaikkrankheit (Kassanis und Sheffield 1941) und bei Kakteen (Weber, Kenda und Thaler 1952; Miličević 1954).

Die Stäbe aus dem Mesophyll waren gewöhnlich gerade, gleichmäßig breit und hatten stumpfe Enden; am häufigsten erstreckten sie sich von einem bis zum anderen Rand der Zelle (Abb. 3 c). In seltenen Fällen wurden in ein und derselben Zelle zwei stab- oder fadenartige Gebilde wahrgenommen. Dem gleichmäßigen Aussehen der Mesophyllkörper gegenüber

boten die Epidermiskörper ein etwas verschiedenartigeres Bild: manchmal waren sie gekrümmt, fast ringförmige Gebilde bildend, oder es befanden sich je zwei Fäden parallel nebeneinander (Abb. 3 e—g).

Auch diese Körper konnten durch Anwendung der Methode Z i m m e r m a n n stark rot gefärbt werden. Wir vermuten deshalb, daß auch die faden- und stabförmigen Körper aus Eiweiß bestehen.

### Zusammenfassung

In der Umgebung von Zagreb wurden viele Exemplare von *Alliaria officinalis* gefunden, die deutliche Symptome einer Mosaikkrankheit zeigten. In den Zellen dieser Pflanzen waren verschiedenartige Viruskörper vorhanden. Ziemlich selten fanden sich durchaus amorphe X-Körper oder Eiweißspindeln, viel häufiger wurden X-Körper mit in ihnen eingebetteten kristallinen Eiweißnadeln beobachtet. Außerdem konnten in einigen Zellen auch stab- und fadenförmige Eiweißkörper wahrgenommen werden. Alle diese Einschlusskörper waren entweder in den Epidermen und im Mesophyll des Blattes oder in der Fruchtknotenepidermis lokalisiert.

### Literatur

- Amelunxen, 1936: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der *Cactaceae*. *Protoplasma* 45.
- Bawden, 1950: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass.
- Kassanis, and Sheffield, 1941: Variation in the cytoplasmic inclusions induced by three strains of tobacco mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 28.
- Köhler und Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. In Sorauers Handb. d. Pflanzenkrankh. Berlin und Hamburg.
- Küster, 1954: Anisotrope Fibrillenbündel in Pflanzenzellen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 52.
- Miličić, 1954: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. *Protoplasma* 43.
- Molisch, 1915: Mikrochemie der Pflanze. Jena.
- Rižkov, 1946: Fitopatogenie virusi. Moskva-Leningrad.
- Rosenzopf, 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlusskörper? *Phyton* 5.
- Smith, 1937: A textbook of plant virus diseases. London.
- Steere and Williams, 1953: Identification of crystalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. *Amer. J. Bot.* 40.
- Weber, Kenda und Thaler, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. *Protoplasma* 41.

# Elektrische Messungen und Reizversuche an *Amoeba proteus*<sup>1</sup>

Von

Karl Umrath

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Graz

(Eingegangen am 30. März 1956)

## Einleitung

Schon 1931 hat Marie Telkes über mikroelektrische Messungen an Amöben berichtet, bei denen sie das Protoplasma gegenüber dem Kulturmedium elektrisch negativ fand. Zugabe von destilliertem Wasser und von stark verdünnten Salzlösungen vergrößerten die Spannung, weniger verdünnte Salzlösungen führten zu ihrer vorübergehenden Senkung oder Umkehr, höhere Salzkonzentrationen führten zu einer dauernden Potentialsenkung oder -umkehr, noch höhere zum Potentialverlust und Tod. Buchthal und Péterfi haben an Amöben auf Agar mit Knopflösung sehr geringe Spannungen wechselnden Vorzeichens gemessen. Es läßt sich schwer sagen, ob die Konzentration der Salze im Außenmedium so hoch war, daß deswegen die gemessenen Spannungen so gering und etwa zur Hälfte positiv und nur zur anderen Hälfte negativ waren oder ob andere Umstände die Messungen beeinträchtigten. Daher habe ich es für wünschenswert gehalten, an *Amoeba proteus* die Spannung zwischen Protoplasma und Außenmedium nochmals zu messen und weiter durch Reize ausgelöste Aktionsströme und Bewegungsreaktionen zu untersuchen.

## Methodik

Die Spannungsmessung erfolgte ähnlich wie bei meinen Untersuchungen an *Nitella* (Umrath 1930, 1932). Als Meßelektroden habe ich Mikroelektroden verwendet, die mit 0,1 oder 0,5 *n* KCl-Lösung gefüllt waren und aus denen ich mit chlorierten Silberdrähten weiter abgeleitet habe. Bei Füllung mit 0,01 *n* KCl-Lösung erwies sich der Widerstand der feinen, einzustechenden Mikroelektrode als zu groß. Vor und nach dem Versuch tauchten die

<sup>1</sup> Herrn Professor Karl von Frisch zum 70. Geburtstag gewidmet.



beiden Ableitungselektroden in dieselbe KCl-Lösung, mit der sie auch gefüllt waren. Während des Versuches befanden sich einige Amöben in etwas Wasser aus ihrer Kultur in einem Uhrschildchen. Die gröbere Elektrode tauchte am Rand in das Wasser, die feinere, mit einem äußeren Spitzendurchmesser von  $5-10\ \mu$ , tauchte zunächst in der Nähe der Amöbe, meist etwa 1 cm von der groben Elektrode entfernt, in das Wasser und wurde dann, bei Beobachtung mit einem binokularen Mikroskop, von oben her in die Amöbe eingestochen. Die Spannung wurde mit einem Lindemann-Elektrometer gemessen, ein Skalenteil entsprach, je nach der Hilfsspannung an den Platten, etwa 8 mV, halbe Skalenteile konnten gut abgelesen werden, mitunter wurden viertel Skalenteile geschätzt. Gereizt habe ich mit einem Induktorium mit Eisenkern mit einem auf geringe Frequenz eingestellten Wagnerschen Hammer und mit zwei Stahlakkumulatoren im Primärkreis. Die Reizstärke wurde durch Veränderung des Rollenabstandes variiert. Die Reizelektroden, chlorierte Silberdrähte, tauchten in einigen Millimetern von der Amöbe in das Wasser.

Die Bewegungsreaktionen beobachtete ich mit dem binokularen Mikroskop bei 26- bis 51facher Vergrößerung. In den Versuchen, in denen die elektrische Spannung der Amöben nicht gemessen wurde, erfolgte die Reizung entweder mechanisch mit einer fein ausgezogenen Glasnadel oder elektrisch mit den schon beschriebenen Induktionsströmen oder mit durch Gleichrichter aus dem städtischen Netz entnommenem Gleichstrom oder Rechteckwechselstrom (Gleichstromstöße wechselnder Richtung, durch Pausen getrennt, Apparat bei Umrath 1926 beschrieben). Die Stromzuleitung erfolgte in allen diesen Versuchen durch umkehrbare Elektroden, Quecksilber mit Kalomelbelag, darüber 0,65%ige NaCl-Lösung mit seitlich angesetzten Pinseln, die mit Leitungswasser getränkt waren und in das Uhrschildchen mit den Amöben tauchten.

### Die elektrische Spannung des Amöbenprotoplasmas

Die in eine Amöbe eingestochene Elektrode nahm eine negative Spannung von wenigen Millivolt bis maximal  $-65\ \text{mV}$  an. Die Zeitdauer, in der eine solche Spannung gemessen werden konnte, war sehr verschieden lang. Blieb der Kontakt mit dem Glasboden des Uhrschildchens, den die Amöbe vor dem Einstich hatte, erhalten oder wurde er bald wieder hergestellt, so kroch die Amöbe meist im Laufe einer oder weniger Minuten von der Elektrode weg. Da das Einstechen der Elektrode einen wenn auch oft nur geringen Reiz darstellt, gibt die Amöbe dabei in der Regel den Kontakt auf, meist nur mit geringfügiger Verkürzung der Pseudopodien. Ich habe versucht, durch Heben der Elektrode die Amöbe in das freie Wasser zu bringen und ihr dadurch das Wegkriechen von der Elektrode zu erschweren und konnte so einige Versuche auf etwa 20 Minuten ausdehnen.

Obzwar ich Messungen, die sich über längere Zeit erstreckten, meist zu Reizversuchen ausnützte, habe ich den Eindruck, daß sich die elektrische Spannung des Amöbenprotoplasmas spontan im Laufe der Zeit stark ändern kann. Ich fand einmal beim Einstich  $-19\ \text{mV}$ , nach der ersten Minute

— 37, nach der dritten — 30, nach der vierten — 22 und nach der fünften Minute — 15 mV. Ich beobachtete in manchen Versuchen bald nach dem Einstich der Elektrode noch eine Zunahme, in anderen eine Abnahme der Spannung.

Für die Mittelbildung habe ich den in jedem Versuch erreichten Höchstwert der negativen Spannung zugrunde gelegt. 29 Versuche mit Elektroden, die mit 0,1 *n* KCl-Lösung gefüllt waren, ergaben für die Spannung zwischen Amöbenprotoplasma und umgebendem Wasser als Mittelwert und mittleren Fehler — 17,5 ± 1,5 mV, 30 Versuche mit Elektroden, die mit 0,5 *n* KCl-Lösung gefüllt waren, — 19,2 ± 2,3 mV, die Differenz ist 1,7 ± 2,7. Die niedersten Werte waren in beiden Versuchsreihen — 8 mV, in beiden waren acht Werte über — 20 mV, die zwei höchsten Werte waren in der ersten Versuchsreihe beide — 37, in der zweiten — 37 und — 65 mV. Die Unterschiede zwischen beiden Versuchsreihen sind wahrscheinlich nur zufällig, und man kann annehmen, daß die Meßresultate davon unabhängig sind, ob die Elektroden mit 0,1 *n* oder mit 0,5 *n* KCl-Lösung gefüllt sind und daß das Protoplasma von *Amoeba proteus* im Mittel — 18 mV gegenüber dem umgebenden Kulturwasser hat.

### Veränderungen an den Elektroden durch die Einstiche in Amöben

Wenn die Elektroden nach der Messung in die KCl-Lösung gebracht wurden, mit der sie auch gefüllt waren, so hatten sie gegeneinander keine Spannung bzw. dieselbe geringe Spannung wie vor der Messung. Mitunter verhielten sich erst einmal verwendete Elektroden in dem Leitungswasser, in dem sich die Amöben befanden, ebenso. In der Regel und insbesondere nach öfterer Verwendung hatte aber die eingestochen gewesene Elektrode in Leitungswasser eine negative Spannung gegenüber der großen Vergleichselektrode; oft habe ich Spannungen zwischen 0 und — 8 mV gemessen, in einzelnen Fällen bis — 11 mV und vielleicht nur deswegen nicht mehr, weil ich solche Elektroden nicht weiter verwendete und durch neue ersetzte. In destilliertem Wasser war die Spannung solcher Elektroden wesentlich größer, — 15 bis — 100 mV, im Mittel von neun Messungen — 60 mV, doch gingen diese Werte im destillierten Wasser im Laufe weniger Minuten auf etwa die Hälfte zurück. Dieser Effekt vergrößerte sich, wenn die Elektroden nach den Messungen durch Stunden in die KCl-Lösung tauchten, mit der sie gefüllt waren und in der sie, wie erwähnt, keine Spannung gegeneinander zeigten. Offenbar bleiben Bestandteile aus der Amöbe an der Elektroden spitze, an der sie eine Membran zu bilden scheinen, die für  $K^+$  permeabler ist als für  $Cl^-$ . Ähnliche Membranbildungen an Elektroden wurden von Umrath (1930, 1932, 1934, 1954) bei elektrischen Messungen an Algenzellen und von Diannelidis und Umrath bei Messungen an Myxomyceten-Plasmodien beobachtet. Die Membraneffekte waren nie das Hauptobjekt der Untersuchung, sondern wurden nur nebenbei beschrieben. Ich habe aber den Eindruck, daß die Membraneffekte an in Pflanzenzellen eingestochen gewesenen Elektroden viel ausgeprägter sind und auch schon in Leitungswasser viel stärker in Erscheinung treten. Die hier beobachteten Membran-

effekte an Elektroden, die in Amöben eingestochen waren, scheinen denen sehr ähnlich zu sein, die Umrath (1954 a) bei seinen Versuchen an Eierstockeiern von Fröschen beschrieben hat. Die eingestochen gewesene Elektrode war hier in destilliertem Wasser und in Glukoselösung stark negativ, der Effekt wurde aber schon durch kleine Salzzusätze stark verringert.

Trotz des beschriebenen Effektes in Wasser sind solche wiederholt verwendete Elektroden noch zu weiteren Versuchen an Amöben brauchbar, wie das ja auch in den oben zitierten Arbeiten an pflanzlichen Objekten der Fall war. Dies ist verständlich, da der Ionengehalt des Protoplasmas vieler Zellen ähnlich ist wie der einer 0,1 n KCl-Lösung.

Eine Elektrode kann aber auch zu Messungen an Amöben unbrauchbar werden. Eine solche hatte nach einigen Einstichen in Amöben in Wasser  $-7$  mV gegen die Vergleichselektrode. Bei weiteren Einstichen in Amöben zeigte sie unmittelbar beim Einstich  $-14$  bis  $-30$  mV, doch ging diese Spannung im Laufe weniger Sekunden sehr stark zurück, nahezu auf  $-7$  mV. Hier scheint eine um die Elektrodenspitze herum gebildete Membran rasch Anschluß an die Zellgrenzschicht der Amöben gefunden zu haben. Mechanisch steckte die Elektrode längere Zeit in den Amöben, aber nicht dem Anschein der elektrischen Messung nach. Erscheinungen, die auf eine solche Abkapselung der Elektrodenspitze schließen lassen, sind von Umrath (1930, 1932, 1934) an Algenzellen und an Zellen höherer Pflanzen und von Diannelidis und Umrath an Myxomyceten-Plasmodien als häufige Erscheinungen beschrieben worden. Daß ich sie bei Amöben nicht öfter beobachtet habe, liegt wahrscheinlich daran, daß die Membranbildung um die Elektroden bei Amöben nur gering ist und an der kurzen Zeit der Messungen, die selten 20 Minuten erreichte.

Nur einmal habe ich beobachtet, daß eine in eine Amöbe eingestochene Elektrode zunächst eine positive Spannung,  $+13$  mV, annahm, die sich dann langsam in  $-11$  mV veränderte. Ein elektrischer Reiz führte zur Abkuglung der Amöbe mit Absinken der Spannung während des Aktionsstroms auf  $-4$  mV und Wiederanstieg auf  $-11$  mV. Nach dem Versuch war die Elektrode in Wasser positiv, was ich sonst nie beobachtet habe, in Leitungswasser  $+39$  mV, in 0,5 n KCl-Lösung, womit sie gefüllt war,  $+9$  mV, in destilliertem Wasser  $+87$  mV, und diese Werte nahmen nur langsam etwas ab.

### Reizversuche und Aktionsströme

In den Versuchen, in denen ich auch Aktionsströme ableitete, habe ich mit rhythmischen Induktionsströmen von ungefähr 4 Schließungs- und 4 Öffnungsschlägen pro Sekunde gereizt. Unter einer gewissen Schwelle waren die Reize ohne erkennbaren Erfolg. Etwas stärkere Reize, von etwa der  $1\frac{1}{2}$ -fachen Reizstärke, führten meist zu noch nicht maximalen Aktionsströmen und nur zu einer mehr oder weniger weitgehenden Verkürzung der Pseudopodien. Die Reizdauer war meist 3–6 sec, bei 20–30 sec Dauer nahm die Reizwirkung höchstens unbedeutend zu. Starke Reize, von etwa der 2- bis  $2\frac{1}{2}$ -fachen Stärke der eben noch unwirksamen und von 3–6 sec

Dauer, hatten einen maximalen Effekt, d. h. sie führten zu maximalen Aktionsströmen und zum Einziehen der Pseudopodien mit mehr oder weniger weitgehender Abkugelung der Amöben.

In 19 Versuchen habe ich Aktionsströme bei elektrischer Reizung beobachtet, in manchen Versuchen nach verschieden starken Reizen. Die Aktionsströme führten in einigen Sekunden zu einem Spannungsrückgang oder einer Spannungsumkehr, worauf ein zunächst rascherer und dann langsamerer Wiederanstieg der negativen Spannung folgte, der zwei bis mehrere Minuten dauerte. In 7 Versuchen führte der Aktionsstrom bei starken Reizen zu einer Potentialumkehr, so daß die Spannung des Protoplasmas gegenüber dem umgebenden Wasser auf der Höhe des Aktionsstroms bei einer Amöbe +11 mV betrug, bei einer anderen bei zwei aufeinanderfolgenden Reizungen +11 und +8 mV, während bei den übrigen 5 Amöben Werte zwischen +4 und +8 mV erreicht wurden. An 5 Amöben führten starke Reize zu Aktionsströmen mit einem Abfall der Spannung des Protoplasmas auf etwa 0 und an 7 anderen Amöben nur zu Spannungsrückgängen auf -4 bis -11 mV. Ob es sich beim Rückgang auf -11 mV noch um eine maximale Reaktion handelte, erscheint mir unsicher, obwohl ich dabei in einem Fall das Einziehen der Pseudopodien notiert habe.

So wie die von mir an Amöben gemessenen Spannungen über einen weiten Bereich streuten, so war auch das Ausmaß der Aktionsströme sehr verschieden. Es war maximal 37 mV, verbunden mit Spannungsumkehr auf +11 mV und minimal 4 mV mit Spannungsrückgang auf -7 mV. In 8 Fällen von Spannungsumkehr während des Aktionsstroms, bei 7 Amöben, war die Spannung vorher im Mittel -21,2 mV, das Ausmaß des Aktionsstroms im Mittel 28,6 mV, in 6 Fällen von Rückgang der Spannung auf 0, bei 5 Amöben, war die Spannung vorher im Mittel -12,2 mV und das Ausmaß des Aktionsstroms 12,2 mV und in 9 Fällen von Spannungsabnahmen, die 0 nicht erreichten, bei 7 Amöben, war die Spannung vor dem Aktionsstrom im Mittel -19,6 mV und das Ausmaß des Aktionsstroms im Mittel 11,9 mV. Die an den Amöben vor dem Aktionsstrom gemessene Spannung war bei Potentialumkehr während des Aktionsstroms im Mittel am größten, und Spannungen des Protoplasmas vor dem Aktionsstrom von -11 mV oder weniger kamen im Fall der Potentialumkehr nicht vor, wohl aber in den beiden anderen Fällen.

Schwächere Reize führten in der Regel nur zu einer vorübergehenden Verkürzung von Pseudopodien und senkten die Spannung des Protoplasmas meist nur auf -13 bis -11 mV, selten bis auf -8 mV. In einzelnen Fällen habe ich nach schwachen Reizen beobachtet, daß die negative Spannung des Protoplasmas erst um einige Millivolt anstieg, ehe der Aktionsstrom mit seinem Spannungsabfall einsetzte.

Ich gebe jetzt noch zwei Versuche auszugsweise wieder, welche die Effekte verschieden starker Reize zeigen; der erste zeigt auch, daß ein Aktionsstrom mit einem Potentialrückgang auf -9 mV schon maximal sein kann. An einer Amöbe war die Spannung des Protoplasmas gegenüber dem Außenmedium einige Minuten nach dem Einstich der Elektrode

— 26 mV, und sie stieg dann auf — 30 mV; ein Reiz, der mit Reizstärke 1 bezeichnet sei, hatte keinen Effekt; Reizstärke 1,5 bedingte einen Aktionsstrom mit Spannungsrückgang auf — 13 mV mit anschließendem Wiederanstieg auf — 26 und — 30 mV; es folgten langsame Spannungsschwankungen bis herunter zu — 13 mV mit schließlicher Stabilisierung bei — 30 mV; ein zweiter Reiz mit Reizstärke 1,5 bewirkte wieder einen Aktionsstrom auf — 13 mV mit Wiederanstieg auf — 35 mV; Reizstärke 2 bedingte einen Aktionsstrom auf — 9 mV mit Wiederanstieg auf — 30 mV; Reizstärke 2,5 bedingte ebenso einen Aktionsstrom auf — 9 mV, die Amöbe war nun abgekugelt, es folgte ein Wiederanstieg der Spannung auf — 26 mV; Reizstärke 5 führte zu Blasenbildung und Absterben der Amöbe mit einem langsamen, stetigen Spannungsrückgang, ohne dem raschen Spannungsabfall, der für den Aktionsstrom charakteristisch ist. Ich halte den Aktionsstrom mit Spannungsabfall auf — 9 mV für maximal, weil er bei Steigerung der Reizstärke von 2 auf 2,5 nicht vergrößert wurde, weil er mit Abkuglung der Amöbe verbunden war und weil ein zweifach stärkerer Reiz schon tödlich war.

An einer anderen Amöbe war das Potential des Protoplasmas einige Minuten nach dem Einstich der Elektrode — 15 mV. Reizstärke 1 war ohne erkennbaren Effekt; Reizstärke 1,5 bedingte einen Aktionsstrom auf — 11 mV, Einziehen der Pseudopodien ohne Abkuglung, Wiederanstieg der Spannung auf — 15 mV und, 5 Minuten nach dem Reiz, auf — 22 mV; Reizstärke 2 bedingte einen Aktionsstrom mit Spannungsumkehr auf + 7 mV mit Abkuglung der Amöbe und Wiederanstieg der Spannung auf — 19 mV mit Schwankungen zwischen — 22 und — 19 mV.

Durch mechanische Reize ausgelöste Aktionsströme habe ich nur gelegentlich zweimal beobachtet. Einmal kugelte sich eine Amöbe infolge einer starken Erschütterung der Elektrode ab, die Spannung ihres Protoplasmas war vorher — 22 mV, sie sank bei der Erschütterung auf 0 und stieg dann wieder bis auf — 15 mV an; ein anderes Mal kugelte sich eine beim Einstich gröber behandelte Amöbe ab, und die Spannung ihres Protoplasmas war beim Einstich 0, erreichte aber nach einiger Zeit — 22 mV. In den meisten Fällen war der Einstich kein starker Reiz, so daß die Pseudopodien nur etwas verkürzt wurden und gleich eine negative Spannung zu messen war, die meist in der ersten Zeit nach dem Einstich etwas zunahm.

Bei den Aktionsströmen geringen Ausmaßes, wie sie nach schwachen Reizen auftreten, könnte es sich um schwächere Erregungen handeln, die sich über die ganze Zelle ausbreiten, wie es bei *Nitella opaca* vorkommt (Umrath 1953), oder es könnte an den distalen Teilen von Pseudopodien zu lokalen Erregungen kommen, die zu teilweisem Einziehen der Pseudopodien und zu Spannungsabnahmen führen, die sich nur abgeschwächt über die anschließenden Teile der Zellgrenzfläche ausbreiten.

Bei mechanischen Reizen hat Verworn schon seit 1889 an durch lange Pseudopodien für diese Versuche geeigneten Rhizopoden, *Diffugia*, *Cyphoderia*, *Orbitolites*, lokale Reaktionen beobachtet, deren Ausmaß, Ausbreitungsentfernung und Ausbreitungsgeschwindigkeit mit der Reizstärke zu-

nahm. Bei *Amoeba proteus* fand ich bei Reizung mit einer fein ausgezogenen Glasnadel, daß ein mechanisch gereiztes Pseudopodium früher und stärker eingezogen wurde als andere, nicht direkt betroffene. Mitunter wurde auch nur das gereizte Pseudopodium eingezogen. Zur vollkommenen Abkuglung führten nur wiederholte, starke Reize.

Ich habe an *Amoeba proteus* auch beobachtet, daß sich Aktionsströme und Bewegungsreaktionen viel leichter durch eine kurze Serie von Schließungs- und Öffnungsinduktionsströmen auslösen lassen als durch einen einzelnen Induktionsstrom. Wahrscheinlich erfolgt bei der Reizserie eine zeitliche Summation lokaler Erregungen und als Folge davon eine Erregungsausbreitung über die ganze Zelle. Da aber die Schließungs- und die Öffnungsinduktionsströme ungleich sind, so ist die Summation eines rein elektrischen Effektes nicht so sicher auszuschließen wie beim Rechteckwechselstrom, den ich deshalb auch anwandte.

Bei Reizung mit Rechteckwechselstrom, d. h. mit Stromstößen wechselnder Richtung, aber gleicher Dauer und gleicher Intensität, die durch Pausen getrennt waren, zeigte es sich, daß die beiden ersten Stromstöße allein zu geringeren Bewegungsreaktionen führten als eine Reizserie von 20–30 sec Dauer. Diese Beobachtung habe ich wiederholt bei folgenden Stromformen gemacht: 1. bei Periodenlänge 4 sec mit 1 sec Gleichstrom, 1 sec Pause, 1 sec Gleichstrom nach der Gegenrichtung, 1 sec Pause usw.; 2. bei Periodenlänge 4 sec, die beiden Stromflußzeiten je 0,1 sec, die Pausen entsprechend je 1,9 sec; 3. bei Periodenlänge 0,68 sec, Stromflußzeiten und Pausen je 0,17 sec. Da bei solchen Rechteckwechselströmen die folgenden Reize nicht stärker sein können als die beiden ersten, kann die stärkere Wirkung der Reizserie nur auf zeitlicher Summation von Erregungen beruhen.

Bisher waren mir die elektrischen Reize nur bequeme und gut dosierbare Mittel zur Auslösung von Erregungsvorgängen. Jetzt will ich die Wirkungen des elektrischen Stromes auf *Amoeba proteus* besprechen. Unter dem Einfluß von Gleichstrom kriecht eine Amöbe zur Kathode. Mast (1931 a) hat diese Erscheinung genauer untersucht und aus verschiedenen Beobachtungen geschlossen, daß Gleichstrom eine Strömung des Plasmasols zur Kathode bewirkt. Es entsteht z. B. an einer monopodialen Amöbe, die vor Stromschluß zur künftigen Anode kriecht, bei Einschaltung der Spannung zuerst am Hinterende eine Strömung zur Kathode, die erst mit der Zeit immer weiter auf das frühere Vorderende übergreift und die Amöbe so zur Umkehr bringt. Am kathodischen Vorderende wird das Plasmagel verflüssigt, die hyaline Kappe vorne wird dünner oder verschwindet, und das Plasmasol strömt bis zum unveränderten Plasmalemma vor. Von der Anode gehen bei stärkeren Strömen Kontraktionen aus und bei noch stärkeren der Zerfall der Amöbe. An Amöben beliebiger Form fand Mast (1931 a) bei schwachen Strömen nur die Hemmung der Pseudopodienbildung an der Seite der Anode, bei stärkeren Strömen ein sofortiges Aufhören der Plasmaströmung bei Stromschluß und dann das Vorfließen von Pseudopodien zur Kathode. Nach meinen Beobachtungen bleiben bei Verkürzung der Reizzeit nur dieser Strömungsstillstand und die Kontraktionen übrig. Bei



Rechteckwechselstrom mit Stromstößen von 1 sec Dauer konnte ich an langgestreckten Amöben noch sehen, daß das Plasmasol gegen die Kathode strömt und daß es bei jedem Richtungswechsel des elektrischen Stromes seine Strömungsrichtung ändert, bis durch die gleichzeitigen Kontraktionen die Amöben mehr oder weniger abgekugelt waren. Je weniger lebhaft die Protoplasmaströmung der Amöben vor der Reizung war und je kürzer die Stromflußzeiten waren, desto mehr traten nur die Systierung der Plasmaströmung und die zur Abkuglung führenden Kontraktionen in Erscheinung. Nur diese sind als Begleiterscheinungen des Erregungsvorganges aufzufassen, denn sie treten in derselben Weise auch nach mechanischen Reizen auf, und sie sind, wie die oben mitgeteilten Befunde zeigen, mit Aktionsströmen verbunden. Das Vorströmenlassen des Plasmasols gegen die Kathode ist eine Sonderwirkung des elektrischen Gleichstroms.

Bei meinen Reizungen der Amöben mit Rechteckwechselstrom von  $\frac{1}{4}$  Periode Stromflußzeit in jeder Richtung und zweimal  $\frac{1}{4}$  Periode Pause habe ich bei Stromflußzeiten von 1, 0,17 und 0,05 sec bei geeigneten Stromstärken an langgestreckten Amöben oft beobachtet, daß sich alle in der Stromrichtung befindlichen Amöben als Folge der Reizung kontrahierten, während die Amöben quer zur Stromrichtung gestreckt blieben. Dies zeigt, daß eine elektrische Längsdurchströmung der Amöben viel wirksamer ist als eine Querdurchströmung, übereinstimmend mit dem, was von Muskeln und Nerven bekannt ist.

Ich habe mich auch für den Einfluß der Stromflußzeit des einzelnen elektrischen Stromstoßes auf die Reizwirkung interessiert und deswegen die Wirkung von Rechteckwechselströmen gleicher Periodendauer, aber mit Stromflußzeiten von  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{1}{40}$  Periodendauer untersucht. Waren dabei die kurzen Reize von  $\frac{1}{40}$  Periodendauer 0,1 und 0,017 sec, so waren sie weniger wirksam als die langen, aber der Wirksamkeitsunterschied war nur gering und wurde durch eine Erhöhung der Stromstärke auf das Eineinhalbfache mehr als ausgeglichen. Bei kurzen Reizzeiten von 0,005 sec schien eine Erhöhung der Stromstärke auf das Zweifache derjenigen bei langen Reizzeiten für den Ausgleich der Wirkungen zu viel, bei kurzen Reizzeiten von 0,003 sec schien diese Erhöhung der Stromstärke auf das Zweifache ungefähr den richtigen Ausgleich der Wirkungen zu geben. Es wäre nach diesen, allerdings nur rohen, orientierenden Versuchen die Chronaxie von *Amoeba proteus* ungefähr 0,003 sec. Langgestreckte Amöben hatten ungefähre Längen von 0,025–0,03 cm, was ich hier erwähne, da nach Umrath (1942, dort auch weitere Literatur) ein Zusammenhang zwischen Chronaxie und Zelllänge besteht.

### Besprechung der Ergebnisse

Meine Messungen der elektrischen Spannung des Amöbenprotoplasmas gegenüber dem Kulturmedium haben im Mittel etwa  $-18$  mV ergeben, und zwar in zwei Meßreihen mit Elektroden, die mit 0,1 KCl-Lösung gefüllt waren,  $-17,5 \pm 1,5$  mV, und mit Elektroden, die mit 0,5 n KCl-Lösung gefüllt waren,  $-19,2 \pm 2,3$  mV. Die Streuung der einzelnen Meßwerte um



diese Mittelwerte ist groß und viel größer als bei den aus den Messungen errechneten, oben angegebenen, mittleren Fehlern sein dürfte, wenn die Abweichungen vom Mittelwert durch zufällige kleine Meßfehler bedingt wären. Im Bereich des dreifachen mittleren Fehlers liegen theoretisch, bei zufallsmäßiger Verteilung, 99,7% der Einzelwerte, tatsächlich aber in der ersten Meßreihe nur 48% und in der zweiten nur 70%. Dieses relativ häufige Vorkommen sehr niedriger Werte, bis zu  $-8\text{ mV}$  herunter und andererseits auch sehr hoher Werte zwischen  $-25$  und  $-65\text{ mV}$ , beruht darauf, daß die Amöben zu verschiedenen Zeiten, in etwas verschiedenen physiologischen Zuständen, verschiedene Spannungen zwischen Protoplasma und Außenmedium haben. Ich habe die oft beobachteten zeitlichen Schwankungen dieser Spannung schon erwähnt. Sie mögen mit der Beweglichkeit und damit starken Veränderlichkeit der Zellgrenzschicht bei den Amöben zusammenhängen, an der ja die elektrische Spannung lokalisiert sein muß.

Ich hätte etwas niedrigere Mittelwerte erhalten, wenn ich von jeder gemessenen Amöbe nicht die höchste gemessene Spannung, sondern einen zeitlichen Mittelwert der Spannung verwendet hätte. Meine Mittelwerte wären aber höher, wenn ich alle Amöben durch längere Zeit, etwa durch 20 Minuten, hätte messen können, weil sich die höheren Werte meist erst nach einiger Zeit einstellen, wahrscheinlich nach Überwindung der Einstichfolgen. Meine Mittelwerte dürften aus diesen Gründen eher zu gering als zu hoch sein. Ich hätte sicher niedrigere Werte erhalten, wenn ich in allen Fällen die Spannung zu Beginn des Versuches genommen hätte. In dieser Weise ist Telkes vorgegangen, weil sie nach der ersten Messung das Kulturwasser durch eine Lösung anderen Salzgehaltes ersetzte. Telkes hatte mit  $n\text{ KCl}$ -Lösung gefüllte Elektroden, in deren Spitzen sie andere Lösungen einsaugen konnte, und sie hat in diesen Versuchen Kulturwasser eingesaugt. Telkes fand Spannungen des Amöbenprotoplasmas gegen das Kulturmedium von  $-10$  bis  $-20\text{ mV}$  mit einem Mittelwert bei  $-15\text{ mV}$ . Diese Werte stimmen mit meinen sehr gut überein und zeigen, mit meinen zusammengehalten, daß es nicht auf die Zusammensetzung der Lösung in der Elektrodenspitze ankommt.

Die von Buchthal und Péterfi an Amöben gemessenen Spannungen liegen um 0, und dies könnte, wie erwähnt, darauf beruhen, daß diese Autoren die Amöben auf Knopagar untersucht haben und daß die Spannung der Amöben nach den Befunden von Telkes sehr salzempfindlich ist. Daß die von Buchthal und Péterfi gemessenen Spannungen keine normale Verteilung um 0 zeigen, sondern bei *Amoeba sphaeronucleolosa* Häufungen um  $+1$  und  $-1\text{ mV}$ , kann auf einer Veränderung der Elektrodenspitze durch das Protoplasma beruhen. Buchthal und Péterfi schreiben S. 480: „Wenn die Elektrodenpotentiale nach der Messung in der Vakuole zur Kontrolle wieder auf Agar gemessen werden, so ist immer noch längere Zeit eine Potentialdifferenz vorhanden. Die Elektroden sind ‚infiltriert‘. Es handelt sich hierbei um eine Eigenschaft der Vakuolenflüssigkeit, da etwa vorhandene Elektrodenpotentiale nach Messung im übrigen Teil

der Zelle sehr schnell wieder verschwinden, wenn sie in Knopflösung oder auf Agar kontrolliert werden.“ Da die Elektrodenpotentiale nach Messung im Protoplasma „sehr schnell wieder verschwinden“, so waren sie doch außerhalb der Zelle zunächst noch vorhanden und die „Infektion“ aus dem Protoplasma scheint nur rascher weggelöst zu werden wie die aus der Vakuole.

Die Reaktion von *Amoeba proteus* auf schwache, kurzdauernde Reize ist eine Verlangsamung, ein Stillstand oder eine kurzzeitige Umkehr der Protoplasmaströmung. Das gilt für elektrische Reize, für Licht (Mast 1931, Folger 1927) und für mechanische Reize (Folger 1926, 1927), und diese Reaktion kann, wie Folger (1927) zeigte, durch Summation allein unwirksamer mechanischer Reize und Lichtreize entstehen. Nach Mast (1931) tritt diese Reaktion immer an der sich vorschiebenden Spitze eines Pseudopodiums ein und besteht in einer Erhöhung der elastischen Kraft des Plasmagels, die so dem Vorfließen des Plasmasols entgegenwirkt. Erst stärkere Reize und vor allem eine Serie stärkerer Reize, am besten als Serie kurzer elektrischer Reize herstellbar, führen zur deutlichen Verkürzung von Pseudopodien und erst hierbei habe ich Aktionsströme beobachtet, die noch nicht von maximalem Ausmaß waren und welche die negative Spannung des Amöbenprotoplasmas gegen das Außenmedium vorübergehend auf  $-13$  bis  $-8$  mV senkten. Erst starke Reizserien, die zum Einziehen der Pseudopodien und zur mehr oder weniger weitgehenden Abkuglung der Amöben führten, fand ich von maximalen Aktionsströmen gefolgt. Diese bestanden je nach der Amöbe, wahrscheinlich je nach dem Zustand der Amöbe, entweder in einer Potentialsenkung auf  $-11$  mV oder weniger oder in einem Potentialrückgang auf 0 oder in einer Potentialumkehr, die bis  $+11$  mV erreichen konnte.

Aus allen diesen Befunden und aus dem Umstand, daß eine Serie alternierender, sonst gleicher elektrischer Reize stärker wirkt wie die zwei ersten Reize allein, kann man sich folgende Vorstellung bilden: Schwache Einzelreize führen zu kleinen, lokalen Erregungen, vor allem an den Enden vorfließender Pseudopodien, die mit den oben beschriebenen, kurzdauernden Strömungsveränderungen verbunden sind. Die elektrischen Veränderungen sind dabei so gering und auf kleine Teile der Pseudopodien beschränkt, daß sie sich bisher vom Amöbenkörper nicht ableiten ließen. Stärkere Reize führen zu größeren und weiter ausgebreiteten lokalen Erregungen und vor allem führen Reizserien durch zeitliche Summation der lokalen Erregungen zu größeren und weiter ausgebreiteten Effekten. So kommt es zum Einziehen von Pseudopodien und zu Kontraktionen der Amöben mit den submaximalen oder maximalen Aktionsströmen.

Die zeitliche Summation lokaler Erregungen tritt bei zeitlichen Abständen der Reize von Bruchteilen einer Sekunde bis zu mehreren Sekunden auf. Bei längeren Reizabständen, nach Versuchen von Folger (1926) mit mechanischen Reizen schon sehr bald, sicher schon bei 45 sec Abstand, wird die Wirksamkeit des zweiten Reizes herabgesetzt, es zeigt sich also ein relatives Refraktionsstadium nach der ersten lokalen Erregung. Ein solches

Verhalten, Summation lokaler Erregungen bei kurzem Zeitabstand, relative Refraktärität bei langem, ist auch sonst von anderen Objekten vielfach bekannt.

### Zusammenfassung

Die elektrische Spannung des Protoplasmas von *Amoeba proteus* gegenüber dem Kulturwasser ergab sich im Mittel zu  $-18$  mV mit Extremwerten von  $-8$  und  $-65$  mV.

Eine Serie genügend starker elektrischer Reize führt zum Einziehen der Pseudopodien und löst einen maximalen Aktionsstrom aus, dessen Ausmaß also mit der Reizstärke nicht mehr zunimmt. Solche maximale Aktionsströme können in einer vorübergehenden Abnahme der Spannung des Protoplasmas auf  $-11$  mV oder weniger bestehen oder in einem vorübergehenden Rückgang dieser Spannung auf 0 oder in einer Spannungsumkehr, die bis  $+11$  mV erreichen kann.

Schwächere Reize, die meist zu einer gewissen Verkürzung der Pseudopodien führen, bedingen submaximale Aktionsströme, die in einer vorübergehenden Abnahme der Spannung des Protoplasmas auf  $-13$  bis  $-18$  mV bestehen.

Da eine Reizserie alternierender, sonst gleicher elektrischer Ströme wirksamer ist als die beiden ersten Reize allein und da in einer solchen Reizserie eine rein elektrische Summation nicht möglich ist, muß man annehmen, daß schon schwache Einzelreize geringe lokale Erregungsvorgänge auslösen, die in ihrem Ausmaß von der Reizstärke abhängig sind und die sich, bei Anwendung einer Reizserie, auch zeitlich stark summieren und dadurch an Ausmaß und an Ausbreitung über die Zelle zunehmen.

### Literatur

- Buchthal F., und T. Péterfi, 1937: Messungen von Potentialdifferenzen an Amoeben. *Protoplasma* 27, 473—483.
- Diannelidis, Th., und K. Umrath, 1953: Über das elektrische Potential und über den Erregungsvorgang bei dem Myxomyceten *Physarum polycephalum*. *Protoplasma* 42, 312—323.
- Folger, H. F., 1926: The effects of mechanical shock on locomotion in *Amoeba proteus*. *J. Morph. a. Physiol. (Am.)* 42, 359—370.
- 1927: The relation between the responses by *Amoeba* to mechanical shock and to sudden illumination. *Biol. Bull. Mar. biol. Labor., Woods Hole (Am.)* 53, 405—412.
- Mast, S. O., 1931: The nature of response to light in *Amoeba proteus* (Leidy). *Z. vergl. Physiol.* 15, 139—147.
- 1931 a: The nature of the action of electricity in producing response and injury in *Amoeba proteus* (Leidy) and the effect of electricity on the viscosity of protoplasm. *Z. vergl. Physiol.* 15, 309—328.
- Telkes, M., 1931: Bioelectrical measurements on amoebae. *Amer. J. Physiol.* 98, 475—483.
- Umrath, K., 1926: Über die elektrische Erregung autonomer Nerven und ihrer Erfolgsorgane. *Z. Biol.* 85, 45—66.

- Umrath, K., 1930: Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinungen. *Protoplasma* 9, 576—597.
- 1932: Die Bildung von Plasmalemma (Plasmahaut) bei *Nitella mucronata*. *Protoplasma* 16, 173—188.
- 1934: Über den Erregungsvorgang bei *Spirogyra* und *Vaucheria* und über Potentialmessungen an Pflanzenzellen. *Protoplasma* 22, 193—202.
- 1942: Zur Theorie der Polarisation an lebenden Zellen. *Protoplasma* 36, 584—606.
- 1953: Über Aktionsstrom und Stillstand der Protoplasmaströmung bei *Nitella opaca*. *Protoplasma* 42, 77—82.
- 1954: Über die elektrische Polarisierbarkeit von *Nitella mucronata* und *Nitella opaca*. *Protoplasma* 43, 237—252.
- 1954 a: Über das elektrische Potential und den Aktionsstrom von Eierstockeiern von *Rana esculenta*. *Protoplasma* 43, 385—401.
- Verworn, M., 1914: Erregung und Lähmung, eine allgemeine Physiologie der Reizwirkungen. Jena, Gustav Fischer.

# Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot

Von

**Horst Drawert und Ingeborg Metzner**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1956)

## I. Einleitung

Der als Diachrom in der Vitalfärbung viel angewandte Azinfarbstoff Neutralrot kann auch als Fluorochrom benutzt werden (Haitinger u. Linsbauer 1933, Haitinger 1938). An Pflanzenzellen haben vor allem Strugger (1940, 1949) und Toth (1952) mit Neutralrot Vitalfluorochromierungen durchgeführt. In den Oberepidermiszellen (O. E.) der Schuppenblätter von *Allium cepa* läßt sich eine grüne bis orangegelbe — je nach dem benutzten Sperrfilter — Kern- und besonders Plasmafluoreszenz erzielen, und in den Zellen der Unterepidermis (U. E.) weisen die im Hellfeld violettrot gefärbten Vakuolen eine rote Zellsaftfluoreszenz auf. Wie zuerst Strugger (1940) beschrieben hat, tritt in den Oberepidermiszellen, deren Vakuolen im Hellfeld zinnoberrot gefärbt sind und die zunächst kaum eine Zellsaftfluoreszenz aufweisen, während der Beobachtung unter der Strahlenwirkung eine grüngelbe Vakuolenfluoreszenz auf. Die vitalgefärbten Unterepidermiszellen zeigen nach Toth (1952) keinen Fluoreszenzwechsel des Zellsaftes.

Während Strugger die mit Neutralrot erhaltene Plasmafluoreszenz auf eine Lösung der Farbbase in Plasmalipoide zurückführt, soll nach Kölbel (1948) eine Kationadsorption vorliegen und die Fluoreszenzerscheinung auf einem Konzentrationseffekt beruhen.

Im Zellsaft der Oberepidermis wird das Neutralrot in ionisierter Form gespeichert, deshalb unterbleibt nach Strugger eine Fluoreszenz. In der Unterepidermis sollen dagegen „volle“ Zellsäfte vorliegen, die eine Bindung des Farbstoffes bedingen, und eine allgemeine Bindung des Farbstoffmoleküls an zelleigene Stoffe soll nach Toth die rote Fluoreszenz bewirken. Eine befriedigende kausale Erklärung der unter dem Strahleneinfluß des

Erregerlichtes auftretenden grünlichen Zellsaftfluoreszenz in der Ober-epidermis steht noch aus. Strugger vermutet einerseits eine Veränderung der Fettsäuren des Zellsaftes unter der Strahlenwirkung und andererseits soll auch das Neutralrot, wenn es vor der Bestrahlung in ionisierter Form vorlag, im Laufe der Bestrahlung allmählich in die molekulare Farbbase übergehen. Kölbel (1948) möchte dagegen auch die Vakuolenfluoreszenz mit dem von ihm postulierten Konzentrationseffekt des Neutralrots erklären. Die Bestrahlung soll eine physiologische „Umstimmung“ des Zellsaftes bewirken, so daß der zunächst im Zellsaft gebundene Farbstoff in Freiheit gesetzt wird und auswandert, dadurch wird die Farbstoffkonzentration in der Vakuole herabgesetzt, was einen Umschlag von schwach rötlicher zu grüner Fluoreszenz zur Folge haben soll.

An Zwiebelepidermen lassen sich aber auch Primärfluoreszenzen beobachten, die durch Behandlung mit verschiedenen selber nicht fluoreszierenden Reagenzien noch verstärkt oder auch erst ausgelöst werden können (Drawert 1952 a).

Bei einigen Zwiebelsorten konnte in den O.E. auch im ungefärbten Zustand eine grünliche Vakuolenfluoreszenz durch die Bestrahlung ausgelöst werden. Die ungefärbte U.E. wies häufig eine rote Vakuolenfluoreszenz auf, die sich unter der Strahlenwirkung nicht änderte. Geschädigtes Cytoplasma und Kerne zeigten allgemein eine grünliche Fluoreszenz. Es war daher von Interesse zu prüfen, ob zwischen diesen Erscheinungen und den nach Vitalfärbung mit Neutralrot zu beobachtenden Fluoreszenzen ein Zusammenhang besteht, und ferner sollte versucht werden, die durch Bestrahlung auszulösende Zellsaftfluoreszenz an vitalgefärbten O.E.-Zellen kausal zu erklären.

## II. Material und Methode

In bezug auf die Eigenfluoreszenz verhalten sich die verschiedenen Zwiebelsorten und auch ein und dieselbe Sorte je nach dem physiologischen Zustand sehr verschieden, so daß man praktisch fluoreszenzfreies Material auslesen kann<sup>1</sup>. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß man Primärfluoreszenz und durch Neutralrot ausgelöste Sekundärfluoreszenz in den meisten Fällen recht gut unterscheiden kann, achteten wir nicht mehr auf völlige Fluoreszenzfreiheit des benutzten Materials.

Die O.E. präparierten wir entsprechend den Angaben von Strugger (1949) frei, und die U.E. wurden durch Oberflächenschnitte gewonnen. Die Schnitte waren im allgemeinen so dick, daß in der Schnittmitte auch noch lebende Mesophyllzellen vorhanden waren, die gleichzeitig beobachtet werden konnten. Außer den beiden Zwiebelepidermen sollen in der vorliegenden Mitteilung nur noch die Blätter von *Helodea densa* berücksichtigt werden.

An Fluoreszenzmikroskopen standen für vergleichende Untersuchungen das Stativ BX der Firma E. Leitz, Wetzlar, mit Bogenlampe (z. T. Mantelkohlen) und das Stativ „Ortholux“ derselben Firma mit dem Philips-Brenner CS 150 zur Verfügung. Später kam noch das Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss-Winkel, Göttingen, mit dem Osram-Brenner HBO 200 dazu. Dieses Stativ hat den Vorteil, daß

<sup>1</sup> Herrn Professor Dr. H. Kappert, Direktor des Instituts für Vererbungs- und Züchtungsforschung der Technischen Universität Berlin, danken wir auch an dieser Stelle vielmals für die Überlassung von Zwiebeln aus seinen Zuchten.

man auch den dazugehörigen binokularen Tubus ohne Bedenken für fluoreszenzoptische Untersuchungen verwenden kann. Die bisher von uns geprüften binokularen und auch monokularen Schrägtuben hatten den Nachteil des recht beträchtlichen Lichtverlustes, so daß sie für kritische fluoreszenzoptische Untersuchungen z. T. unbrauchbar waren (Drawert 1952 b, 1955 a). Vorwiegend wurde im Blaulicht gearbeitet, daneben vergleichsweise aber auch immer U. V. benutzt.

Folgende Neutralrotpräparate wurden untersucht:

Neutralrot „stand.“ (Bayer, Leverkusen).

Neutralrot extra (Grübler u. Co., Stuttgart-Untertürkheim).

Neutralrot (pH = 6,8–8,0) (Merck, Darmstadt).

Im allgemeinen kamen Lösungen 1:10.000 in dest. Wasser, Leitungswasser oder Phosphatpuffer zur Anwendung. Die Lösungen wurden durch Verdünnen von Stammlösungen 1:1000 in dest. Wasser hergestellt. Die Stammlösungen waren längere Zeit haltbar, mit Ausnahme des Präparates von Merck, das allmählich einen Niederschlag zeigte.

### III. Eigenschaften des Neutralrots

Von den Eigenschaften des Neutralrots sollen hier die im Zusammenhang mit den folgenden Untersuchungen besonders interessierenden Fluoreszenzerscheinungen berücksichtigt werden. Eine alkoholische Neutralrotlösung zeigt nach den Farbstofftabellen von Schultz (1951) eine schwach braunrote Fluoreszenz, und mit NaOH entsteht ein gelbbrauner Niederschlag, dessen alkoholische und ätherische Lösung stark fluoresziert. Nach Szabellédy und Sik (1938) soll Neutralrot auf Grund seiner pH-abhängigen Fluoreszenz als Fluoreszenzindikator brauchbar sein. Bereits Rothberger (1898) berichtet, daß Neutralrotgelatine unter Einwirkung von Ammoniakdämpfen eine Fluoreszenz aufweist, die aber nach wenigen Sekunden verschwindet. In den eigenen Versuchen war erst ab pH 7 eine intensivere rot-orange Fluoreszenz der wässrigen Lösungen zu beobachten. Mit diesen Angaben stehen die Befunde von Strugger (1940), daß die freie, molekular gelöste Base in Wasser eine starke orangegelbe Fluoreszenz aufweist, in gutem Einklang. Mit neutralen hydrophoben Lösungsmitteln läßt sich die Neutralrotbase aus der wässrigen Phase ausschütteln. Dabei erfährt die Fluoreszenz eine Intensitätssteigerung und einen Umschlag des Farbtons nach Grüngelb. Für tierische Fettzellen gibt Haitinger (1938) nach Färbung mit Neutralrot eine goldgelbe Fluoreszenz an, die an der Luft in eine grünlichblaue übergeht.

Für Lösungen in dest. Wasser beschreibt Strugger nur eine schwache Fluoreszenz, die sich mit der Farbstoffkonzentration etwas ändert. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, konnten wir dies bestätigen, wenn auch die von uns angeführten Farbtöne etwas von den von Strugger beschriebenen abweichen. Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, da Strugger nicht das gleiche Präparat untersucht hat und es sich außerdem um rein subjektive Eindrücke handelt.

In Tab. 1 sind ferner Intensität und Farbton von Neutralrot angeführt, das auf Filtrierpapier aufgetropft war. Die Angaben beziehen sich auf die getrockneten Farbflecke. Die weitaus intensivste Fluoreszenz zeigte die adsorbierte 1:10.000-Lösung. Dieselbe Intensität wurde höchstens noch von der Peripherie der Flecke der 1:1000-Lösung erreicht. Es handelt sich wohl auch hierbei um eine Fluoreszenz der Farbbase, die bei der Lösung 1:1000 von den kaum fluoreszierenden Molekülen des Salzes bzw. den Kationen mehr oder weniger verdeckt wird. Es dürfte wohl kaum ein Konzentrationseffekt im Sinne von Kölbl vorliegen. Doch müßte diese Frage noch eingehender nachgeprüft werden.

Da die Fluoreszenz der Farbstoffe im adsorbierten Zustand häufig intensiver



oder auch in einem anderen Farbton als in gelöster Form sein kann, wurde von einer abgestuften pH-Reihe Farbstofflösung auf Filtrierpapier getropft und nach dem Auftrocknen auf eine Fluoreszenz geprüft. Die Flecken zeigten folgende Fluoreszenztöne: pH 2 und 3 = schwach cyclamenrot, pH 4 und 5 = rot mit einem Stich ins Orange, etwas stärker als bei pH 2 und 3, pH 6 = recht intensiv rotorange, pH 7 und 8 = intensiv rotorange.

Ferner tritt auch bei Reduktion des Neutralrots eine gelbgrüne Fluoreszenz auf. Als erster beschreibt wohl Rothberger (1898) diese Erscheinung von *Escherichia coli*-Kulturen auf Neutralrotagar bzw. -gelatine. Nach 24stündiger Bebrütung haben sich die Nährsubstrate mehr oder weniger stark entfärbt und zeigen eine dunkel- bis gelbgrüne Fluoreszenz. Die Fluoreszenz ist nur bei Sauerstoffabschluß zu beobachten.

Tab. 1. Neutralrot extra (Grübler) in dest. Wasser (pH 6,3) gelöst. Fluoreszenz der Lösung und des auf Filtrierpapier aufgetragenen Neutralrots in Abhängigkeit von der Konzentration.

Konzentration	pH-Wert der Lösung	Fluoreszenzintensität und Farbton	
		der Lösung	an Filtrierpapier adsorbiert
1 : 1000	4,0	äußerst schwach dunkelrot	rotorange, an der Peripherie des Flecks mehr rein orange und intensiver
1 : 10.000	5,2	schwach rotorange	sehr intensiv orangefarben
1 : 100.000	6,0	schwach hellrotorange	schwächer eosinrot
1 : 1.000.000	6,2	sehr schwach rosa-orange	schwach rosaorange, an der Peripherie des Flecks etwas intensiver

Nach Clark und Perkins (1932) entsteht bei langsamer Reoxydation zwischen pH 0 und 6 eine fluoreszierende Substanz, das „Fluoreszent X“ (Lewis 1935), die nicht mit dem Leukoneutralrot identisch sein soll. Eigene Versuche mit Natrium-Hyposulfit ergaben sofort nach Zugabe des Reduktionsmittels zu einer Neutralrotlösung 1 : 10.000 in dest. Wasser eine intensive grüne Fluoreszenz, deren Intensität mit fortschreitender Reduktion abnahm. Mit der Reoxydation wurde die Intensität wieder stärker, und der Farbton im U. V. ging mit dem Auftreten der Rotfärbung im normalen Licht in Orange über.

Aus den geschilderten Befunden können wir schließen, daß das Neutralrotkation nur im adsorbierten Zustand eine rötliche Fluoreszenz aufweist, während die Farbbase in wässriger Lösung, in hydrophoben Medien gelöst und in adsorbierter Form eine gelbe bis grüne Fluoreszenz besitzt. Ferner treten bei der Reduktion des Farbstoffes grüne Fluoreszenzerscheinungen auf, die unter Umständen auf der Bildung einer besonderen Substanz, des „Fluoreszent X“, beruhen.

Mit Hilfe dieser Fluoreszenzeigenschaften des Neutralrots müssen wir die an lebenden Zellen zu beobachtenden Fluoreszenzerscheinungen zu erklären versuchen. Bei anderen Farbstoffen, wie beim Janusgrün B oder dem Coelestinblau, spielen Reduktionsvorgänge in der lebenden Zelle für die

auf tretenden Fluoreszenzerscheinungen eine große Rolle (Drawert 1953, 1954). Für Neutralrot sind aber auf Grund seines hohen negativen Redoxpotentials Reduktionsvorgänge in der lebenden Zelle, von wenigen Ausnahmen abgesehen, sehr unwahrscheinlich, so daß die wohl nächstliegende Erklärungsmöglichkeit von vornherein ausschaltet, doch müssen wir dies erst beweisen.

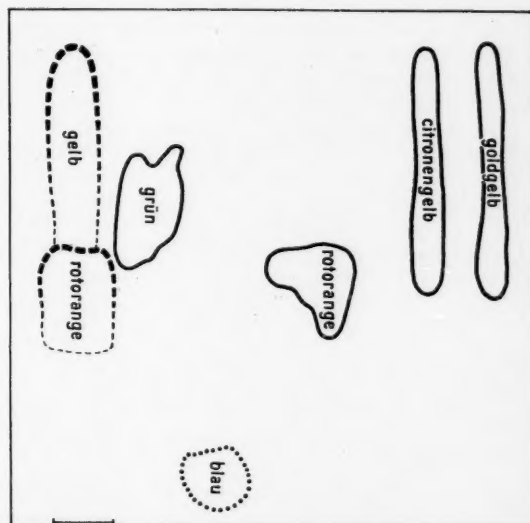


Abb. 1. Ein- und zweidimensionales Papierchromatogramm von Neutralrot extra (Grübler). In dem mit Aceton + Leitungswasser (4:6) entwickelten eindimensionalen Chromatogramm treten die beiden mit unterbrochenen Linien angedeuteten Komponenten auf. Diese Komponenten lassen sich mit tert. Butylalkohol + Eisessig + Leitungswasser (4:1:5) noch weiter zerlegen, wie die mit ganzen Linien angedeuteten Flecken zeigen. Der mit einer punktierten Linie umgrenzte Fleck gibt die Lage der manchmal im zweidimensionalen Chromatogramm des Merck-Präparates auftretenden, blau fluoreszierenden Komponente an.

Ehe wir uns den Vitalfluorochromierungsversuchen zuwenden, müssen wir noch die benutzten Neutralrotpräparate einer eingehenden Analyse unterziehen, da die Präparate nicht identisch zu sein brauchen und u. U. Fluoreszenzerscheinungen auch auf Verunreinigungen beruhen können, wie es für einige Brillantkresylblaupräparate nachgewiesen werden konnte (Drawert und Metzner 1955).

Im Spektroskop zeigten die drei untersuchten Präparate in der wässrigen Lösung keine Unterschiede. Die Lösungen 1:10.000 in dest. Wasser hatten die Hauptabsorptionsbande bei 530–540 m $\mu$ . Nach den Farbstofftabellen von Schultz (1931) liegt das Absorptionsmaximum einer wässrigen Lösung von Neutralrot extra bei ungefähr 526 m $\mu$ , und Conn (1953) gibt allgemein 540–452 m $\mu$  an.

Auch in den Papierchromatogrammen traten nur geringfügige Unterschiede zwi-

schen den drei Präparaten auf. Die Farbstoffe wurden in Lösungen 1 : 1000 in dest. Wasser aufgetragen und mit Aceton + Leitungswasser (L. W.) = 4 : 6 entwickelt. Mischungen von tert. Butylalkohol + Eisessig + L. W. = 4 : 1 : 5 oder Äthylalkohol (96%) + L. W. = 1 : 4 lieferten ähnliche Ergebnisse. Das Acetongemisch hat sich aber am besten bewährt. Im aufsteigenden eindimensionalen Chromatogramm ist einer roten Komponente eine lange schwach orangegelbe Fahne vorgelagert (Abb. 1). Im U. V. leuchtet der im normalen Licht als grauer Strich erkennbare Start orange, daran schließt sich eine zunächst nur schwach orange fluoreszierende Fahne, deren Intensität zunimmt, je weiter wir uns vom Start entfernen, und die ihren Höhepunkt an der oberen Grenze des auch im normalen Licht sichtbaren roten Flecks erreicht. Daran schließt die intensiv gelb fluoreszierende Fahne an, deren Intensität sich auch in Richtung der Lösungsmittelfront steigert.

Im zweidimensionalen Chromatogramm konnte die gelbe Fahne noch weiter zerlegt werden, und zwar traten — in der Reihe mit abnehmenden  $R_f$ -Werten — eine auch im normalen Licht gut sichtbare, im U. V. goldgelb fluoreszierende und eine nur schwach sichtbare, aber zitronengelb fluoreszierende Komponente auf (Abb. 1). Neutralrot extra (Grübler) zeichnete sich ferner noch durch eine nur im U. V. wahrnehmbare, schwach grünlich fluoreszierende Komponente aus. Diese grünliche Komponente hatte aber nur eine kurze Lebensdauer. In älteren Papierchromatogrammen war sie nicht mehr zu erkennen. Bei dem Präparat von Merck trat außerdem noch manchmal — nicht immer — ein ganz zart blau fluoreszierender Fleck auf.

Im Elektrophoreseversuch auf Filtrierpapier mit 240 V und 3,5 mA bei pH 4,9 wanderte die rote Komponente zur Kathode. Die anderen Komponenten waren nicht zu erkennen.

Versuche, die einzelnen Komponenten mit Hilfe der Säulenchromatographie mit Aluminiumoxyd zu trennen, schlugen fehl. Bei Benutzung von neutralem  $Al_2O_3$  blieb zwar eine rote Phase adsorbiert und eine gelbe lief hindurch; Papierchromatogramme beider Phasen zeigten aber, daß keine scharfe Trennung erfolgt war.

#### IV. Vitalfluorochromierungen mit Neutralrot

##### a) Oberepidermen der Schuppenblätter von *Allium cepa*

An den O. E.-Zellen von *Allium* können mit Neutralrotlösungen 1 : 10.000 in Leitungswasser die von Strügger (1940) und von Toth (1952) erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Im normalen Licht zeigen die Zellen ruhender Zwiebeln zinnoberrote Zellsaftfärbung und Vakuolenkontraktion. Im Blaulicht (Filter BG 12, 3 mm einfach oder doppelt) und OG 1,4 oder 5 als Sperrfilter weisen die Zellen eine gute, je nach benutztem Sperrfilter goldgelbe bis orange Plasmafluoreszenz auf. Im U. V. (UG 2 + UG 5 oder UG 1 verschiedener Dicke) und BG 23 + GG 4 oder U. V. 2,5 als Sperrfilter besitzt das Plasma eine silbrige bis bläulich weiße Fluoreszenz. Besonders bei der Benutzung der Quecksilberhöchstdrucklampen schlägt der Farbton des fluoreszierenden Plasmas unter der Strahlenwirkung in kürzester Zeit nach Gelbgrün (OG-Sperrfilter) bzw. Grün (andere Sperrfilter) um. Das Plasma zeigt dabei in den Zellwänden eine granuliert bis netzartige Struktur. Häufig führt es nicht fluoreszierende kleinere Vakuolen, die im normalen Licht mehr oder weniger intensiv zinnoberrot gefärbt sind. Unter der Strahlen-

wirkung zeigt aber nicht nur das lebende Plasma eine Änderung des Farbtons, sondern auch das tote. Mit Neutralrot gefärbtes totes Plasma fluoresziert gelb bis rotorange und nimmt während der Beobachtung unter Steigerung der Fluoreszenzintensität ebenfalls einen gelbgrünen Farbton an.

Ferner beginnen entsprechend den Angaben von Strügger und später von Toth unter der Strahlenwirkung die Vakuolen mit zunehmender Intensität gelbgrün zu fluoreszieren. Bei treibenden Zwiebeln tritt mit Neutralrot in der O.E. eine Mosaikfärbung auf, d. h. neben zinnoberrot gefärbten Zellen mit Vakuolenkontraktion befinden sich auch sehr intensiv violett gefärbte Zellen ohne Vakuolenkontraktion. Zwischen diesen beiden Extremtypen gibt es alle Übergänge. Die im Hellfeld violett gefärbten Zellen zeigen besonders gut im U. V. (UG 1) mit dem Sperrfilter U. V. 2,5 eine rote Zellsaftfluoreszenz. In der Umfärbung der Plasmafluoreszenz durch die Strahlenwirkung besteht kein Unterschied zwischen den Zellen mit zinnoberrot und violett gefärbten Zellsäften. Eine gelbgrüne Zellsaftfluoreszenz kann aber durch die Bestrahlung nur in den zinnoberrot gefärbten Zellen ausgelöst werden, worauf bereits Toth hingewiesen hat.

In den mit Glucose, Saccharose oder  $\text{KNO}_3$  plasmolysierten Zellen verhalten sich die Protoplasten wie die in den unplasmolysierten, hier wird aber durch die Bestrahlung auch eine gelbgrüne Fluoreszenz im extraplasmatischen Raum, also zwischen kontrahiertem Protoplasten und Zellwand, ausgelöst.

Zwischen den Fluoreszenzerscheinungen besonders des Zellsaftes der mit Neutralrot vital gefärbten O.E.-Zellen und der Fluoreszenz ungefärbter O.E.-Zellen (Drawert 1952 a) bestehen gewisse Parallelen. Bei bestimmten Zwiebelsorten beginnt der zunächst nicht fluoreszierende ungefärbte Zellsaft unter der Strahlenwirkung z. T. intensiv gelbgrün zu leuchten. Bei treibenden Zwiebeln haben wir von vornherein Zellen, die eine rote Vakuolenfluoreszenz aufweisen. Unter der Strahlenwirkung ändert sich diese rote Zellsaftfluoreszenz nicht.

Bei einer Vitalfärbung mit Neutralrot färbt sich der Zellsaft der zunächst nicht fluoreszierenden Zellen zinnoberrot unter Kontraktion der Vakuole, die Zellen mit roter Primärfluoreszenz des Zellsaftes färben sich dagegen violett ohne Vakuolenkontraktion.

Es war naheliegend, zwischen der Zellsaftfluoreszenz ungefärbter und der mit Neutralrot gefärbter Zellen einen direkten Zusammenhang anzunehmen. Diese Vermutung hat sich aber für die grüne Zellsaftfluoreszenz nicht bestätigt; denn die gelbgrüne Zellsaftfluoreszenz der bestrahlten ungefärbten Zellen wird durch die Strahlen in recht kurzer Zeit gelöscht, während die der gefärbten Zellen lange erhalten bleibt. Ferner kann nicht bei allen Zwiebeln in den zunächst nicht fluoreszierenden O.E.-Zellen allein durch die Bestrahlung eine vorübergehende grüngelbe Zellsaftfluoreszenz ausgelöst werden, dies ist aber bei allen bisher geprüften, mit Neutralrot

gefärbten O.E.-Zellen möglich, sobald der Zellsaft einen zinnoberroten Farbton aufweist. Für die roten Zellsaftfluoreszenzen besteht schon eher die Möglichkeit eines Zusammenhanges, doch soll darauf bei der Besprechung des Verhaltens der Unterepidermis noch näher eingegangen werden (siehe S. 367).

Die durch Bestrahlung ausgelösten Zellsaftfluoreszenzen nach Neutralrotfärbung sind bisher nur von Zellen mit einer Vakuolenfärbung beschrieben worden. Besonders im Hinblick auf die theoretische Erklärung dieser Erscheinung durch Kölbel (1948) war es aber von größtem Interesse, auch Zellen mit nur reiner Membranfärbung daraufhin zu prüfen. Es wurden deshalb Färbungen mit Neutralrotlösungen verschiedener cH durchgeführt und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

pH 2: Nach 10 Min. Färbedauer zeigen die Zellen noch Plasmaströmung. Im Hellfeld sind höchstens die Tüpfelschließhäute schwach rot gefärbt, sonst sind die Zellen farblos. Im Blaulicht fluoresziert nur das tote Plasma und die toten Kerne orange. Auch längere Bestrahlungsdauer ändert nichts an diesem Bild.

pH 3: Im Hellfeld sind die Membranen gut gefärbt, und die Zellen besitzen eine lebhaft Plasmaströmung. Im Blaulicht beginnt allmählich das Plasma zart grüngelb zu fluoreszieren und nach längerer Strahlenwirkung auch der Zellsaft.

pH 4: Im Hellfeld ist dasselbe Färbungsbild zu beobachten wie bei pH 3. Die Vakuolen erscheinen völlig farblos. Im Blaulicht beginnen sehr schnell Plasma und Kerne grüngelb zu fluoreszieren, daran anschließend auch der Zellsaft.

pH 5: Auch hier ist im Hellfeld noch reine Membranfärbung vorhanden, die Vakuolen sind völlig farblos. Im Blaulicht weist das Plasma von vornherein eine orangegelbe Fluoreszenz auf, die sehr schnell nach Grüngelb umschlägt. Die Vakuolen beginnen unter der Strahlenwirkung sehr schnell intensiv gelbgrün zu fluoreszieren.

pH 6: Bei völlig ruhenden Zwiebeln ist auch bei diesem pH-Wert nur eine reine Membranfärbung zu erkennen, die allerdings etwas schwächer als bei pH 5 ist. Im Blaulicht tritt dasselbe Färbungsbild und dieselbe Umfärbung wie bei pH 5 auf.

pH 7: Im Hellfeld besitzen alle Zellen eine reine zinnoberrote Zellsaftfärbung. Die Membranen sind farblos. Die Zellen zeigen eine ausgeprägte Vakuolenkontraktion. Im Plasma der Zellwinkel sind häufig intensiver rot gefärbte kleine Vakuolen eingelagert. Im Blaulicht fluoresziert das Plasma orange, doch schlägt diese Fluoreszenz in kürzester Zeit in ein intensives Grüngelb um. Die kleinen Plasmavakuolen fluoreszieren nicht. Auch ist hier besonders deutlich zu erkennen, daß der Kern selber nicht fluoresziert. Der Zellsaft beginnt ebenfalls in kürzester Zeit gelbgrün zu leuchten.

pH 8: Das Färbungs- und Fluoreszenzbild entspricht dem bei pH 7.

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe müssen wir als wichtigsten Punkt hervorheben, daß auch bei einer reinen Membranfärbung die im Hellfeld farblos erscheinenden Vakuolen im Blaulicht unter der Strahlenwirkung grüngelb zu fluoreszieren anfangen. Allerdings ist bei gleichen Färbungszeiten die Fluoreszenz um so intensiver und setzt um so schneller nach Strahlungsbeginn ein, je mehr sich der pH-Wert der Farbstofflösung dem Neutralpunkt nähert.

b) Unterepidermen der Schuppenblätter von  
*Allium cepa*

Die U.E.-Zellen zeichnen sich bekanntlich dadurch aus, daß sie das Neutralrot unabhängig vom physiologischen Zustand der Zwiebel immer einheitlich mit einem violetten Farbton speichern. Ohne besonderen Wundreiz tritt in der U.E. auch keine Vakuolenkontraktion auf. Im Blaulicht und noch deutlicher im U.V. zeigen die violett gefärbten Vakuolen bei entsprechenden Sperrfiltern eine leuchtend rote Fluoreszenz, wie sie bereits von Toth (1952) beschrieben worden ist.

Die Membranen besitzen häufig über den Antiklinen gelb bis grüngelb fluoreszierende Granula. Cytoplasma und Kern sind zunächst völlig ohne Fluoreszenz, wie besonders Wundrandzellen mit starker Vakuolenkontraktion gut erkennen lassen. Aber auch in den anderen Zellen hebt sich der Kern bei entsprechender Lage als dunkler Fleck von dem rot fluoreszierenden Zell-Lumen ab. Nur bei der Verwendung von U.V. (UG 1) mit dem Sperrfilter UV 2,5 ist eine bläuliche Fluoreszenz des Plasmas zu erkennen, die aber auch in ungefärbten Zellen auftritt, es handelt sich also um eine Primärfluoreszenz. Unter der Strahlenwirkung — besonders rasch im Blaulicht — beginnen Plasma, Kerne und z. T. auch Membranen intensiv gelbgrün zu leuchten. Die Vakuolen scheinen, wie es auch Toth angibt, ihre Fluoreszenzfarbe nicht zu ändern. Die rote Vakuolenfluoreszenz wird nur durch das intensiv gelbgrün leuchtende Plasma mehr oder weniger stark überdeckt. Außerdem wird das ganze Gesichtsfeld von einem grünen Schleier überzogen. In plasmolysierten U.E.-Zellen beginnt auch der extraplasmatische Raum grünlich zu fluoreszieren.

Die den Schnitten noch anhaftenden lebenden Mesophyllzellen verhalten sich wie die O.E., d. h. sowohl das Plasma wie der Zellsaft der gefärbten Zellen nehmen unter der Strahlenwirkung eine intensive grüngelbe Fluoreszenz an.

Wie ein Teil der O.E.-Zellen treibender Zwiebeln besitzen die Vakuolen der U.E. eine rote Primärfluoreszenz. Dazwischen befinden sich immer Idioblasten mit gelbgrüner bis grüner Vakuolenfluoreszenz, die aber nach kurzer Bestrahlungsdauer abbläßt und einer roten Zellsaftfluoreszenz weicht. Die Idioblasten unterscheiden sich dann nicht mehr von den anderen U.E.-Zellen, so daß alle Zellen eine gleichmäßige rote Vakuolenfluoreszenz aufweisen, die auch durch eine längere Bestrahlung nicht beeinflusst wird. Da die rote Zellsaftfluoreszenz der mit Neutralrot vitalgefärbten U.E. auch für längere Zeit strahlungsfest ist, könnte man vermuten, daß hier nur die rote Primärfluoreszenz des Zellsaftes vorliegt. Allerdings ist die Fluoreszenz der gefärbten Zellen i. a. intensiver als die der ungefärbten. Wieweit wirklich eine Neutralrotfluoreszenz oder nur eine Verstärkung der Eigenfluoreszenz des Zellsaftes auftritt, müssen erst weitere Versuche klären.

In den Versuchen mit Farbstoffreihen von pH 2 bis 8 fiel bei den U.E. auf, daß auch bei pH 2 unter der Strahlenwirkung eine grüne Membranfluoreszenz erschien, während in den O.E. bei dieser pH-Stufe zunächst keine Änderungen zu beobachten waren.



c) Blättchen von *Helodea densa*

Treten in den Wundrandzellen der U. E. von *Allium cepa* nach Neutralrotfärbung stark gefärbte Entmischungstropfen auf, so zeichnen sich diese durch ihre Fluoreszenzfreiheit aus. Diese interessante Tatsache hat auch Toth bei verschiedenen Objekten beobachtet. Bei der diffusen Zellsaftfärbung wissen wir nicht, in welchem Zustand sich der Farbstoff in der Zelle befindet. Bilden sich intensiv gefärbte Entmischungsaggregate, so kann man dagegen mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß der Farbstoff sich mit zelleigenen Bestandteilen chemisch oder mindestens adsorptiv verbunden hat. Es war nun von Interesse, ein Objekt, das das Neutralrot bevorzugt in Krümelform und weniger diffus im Zellsaft speichert, auf Fluoreszenzerscheinungen hin zu untersuchen. Hierfür eignen sich die Blättchen von *Helodea densa*.



Abb. 2. Elektive Fluorochromierung der Schleimzellen in den Blättchen von *Helodea densa* mit Neutralrot.

Die ungefärbten *Helodea*-Blättchen zeigen im Blaulicht eine intensive rote Chlorophyllfluoreszenz. Mit den Sperrfiltern OG 4 und OG 5 sind die Schleimzellen entweder fluoreszenzfrei oder sie leuchten grünlich. Im U.V. mit BG 23 + GG 4 oder auch nur GG 4 allein als Sperrfilter fluoreszieren die Schleimzellen immer mehr oder weniger intensiv weißblau. Zugabe von  $\text{NH}_4\text{OH}$  bedingt im Blaulicht mit OG 4 + OG 5

eine intensive seegrüne Fluoreszenz der Schleimzellen. Im U. V. mit BG 23 + GG 4 ist dagegen nach  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Zugabe weder eine Farbton- noch eine Intensitätsänderung in der Fluoreszenz der Schleimzellen wahrzunehmen.

Nach einem Aufenthalt der Blättchen in einer Neutralrotlösung 1 : 10.000 in Leitungswasser, in Phosphatpuffer mit pH 7 oder auch in dest. Wasser haben die Zellen beider Blattseiten den Farbstoff in Krümelform mehr oder weniger stark gespeichert. Die Schleimzellen sind im Hellfeld i. a. farblos. Im Blaulicht mit OG 4 + OG 5 als Sperrfilter leuchten die Schleimzellen jetzt aber intensiv goldgelb (Abb. 2). Im U. V. mit den entsprechenden Sperrfiltern ist dagegen wie bei der  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Zugabe auch nach der Neutralrotfärbung nur die bläulichweiße Eigenfluoreszenz der Schleimzellen zu erkennen.

Die Chlorophyllfluoreszenz erlischt in den neutralrotgefärbten Zellen unter der Strahlenwirkung bedeutend schneller als in den ungefärbten Blättchen. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß im normalen Hellfeld die Chloroplasten in einigen Zellen — besonders längs der Mittelrippe — eine rote Granafärbung aufweisen. Diese Plastiden machen, verglichen mit den „ungefärbten“, schon einen etwas degenerierten Eindruck, andererseits zeigen aber auch diese Zellen häufig noch eine lebhafte Plasmaströmung.



Eine Vitalfärbung der Chloroplasten mit Neutralrot haben bereits Weber (1930) für *Helodea canadensis* und Diannelidis (1951) für *Halophila stipulacea* beschrieben. Eine deutlich sichtbare Färbung der Plastiden scheint aber nur in einem bestimmten physiologischen Zustand der Zellen einzutreten. Nach den Angaben von Weber und auch von Diannelidis handelt es sich bei den Zellen mit vitalgefärbten Chloroplasten doch schon um Zellen, die einen gewissen Schädigungsgrad erreicht haben oder kurz vor dem Absterben stehen. Dafür sprechen auch unsere Beobachtungen, so daß es vielleicht richtiger wäre, von einer prämortalen Färbung zu sprechen.

Die reichlichen Farbstoffkrümel in den Zellen zeigen weder im Blaulicht noch im U. V. eine Fluoreszenz. Daran ändert auch eine längere Bestrahlung nichts.

Unter der Strahlenwirkung beginnen aber im Blaulicht mit OG-Sperrfiltern die Membranen und das Cytoplasma intensiv gelb zu fluoreszieren. Die goldgelbe Fluoreszenz der Schleimzellen schlägt unter der Strahlenwirkung nach Grüngelb um. Wie die U. E. von *Allium* überziehen sich auch die *Helodea*-Blättchen während der Beobachtung im ausgeleuchteten Feld allmählich mit einem grünen Schleier.

Manchmal ist der Inhalt der Schleimzellen nicht homogen, sondern besteht aus größeren oder kleineren runden Schleimballen, die dicht gehäuft das Zell-Lumen ausfüllen. Nach einer Vitalfärbung mit Neutralrot fluoreszieren außer der Peripherie des Zell-Lumens diese Schleimballen distinkt goldgelb. Unter der Strahlenwirkung lösen sich die Ballen aber auf, so daß nach kurzer Zeit die Schleimzellen homogen grüngelb fluoreszieren. In diesen Blättchen führen auch die chlorophyllführenden Zellen ähnliche Ballen meist in Einzahl, die ebenfalls mit Neutralrot eine goldgelbe Fluoreszenz annehmen. Im U. V. zeigen diese Ballen im ungefärbten Zustand eine bläulichweiße Eigenfluoreszenz, die in ihrem Farbton der Fluoreszenz der ungefärbten Schleimzellen unter denselben Bedingungen entspricht.

Mit Acridinorange 1:10.000 in Leitungswasser vitalgefärbte *Helodea*-Blättchen führen in den chlorophyllhaltigen Zellen gelbe Krümel, und die Schleimzellen sind z. T. diffus bräunlichgelb gefärbt. Im Blaulicht fluoreszieren die Schleimzellen intensiv grün und die Farbstoffkrümel kupferrot. Tote Zellen zeigen eine grüne Kernfluoreszenz. Zugabe von  $\text{NH}_4\text{OH}$  löst in den lebenden Zellen augenblicklich eine grüngelbe Kern- und Membranfluoreszenz aus. Im U. V. ist wie bei den neutralrotgefärbten Schleimzellen auch nach Acridinorangebehandlung nur die bläulichweiße Eigenfluoreszenz zu erkennen. Ebenso weisen die Schleimzellen, mit Berberinsulfat gefärbt, eine intensive gelbe Fluoreszenz nur im Blaulicht auf.

## V. Versuche zur Klärung der sekundären gelbgrünen Vakuolenfluoreszenz

Das Auffälligste bei der Fluorochromierung mit Neutralrot ist die durch die Bestrahlung ausgelöste sekundäre Vakuolenfluoreszenz in den Zellen der O. E. von *Allium*. Die folgenden Untersuchungen sollen sich auf einen Klärungsversuch dieser Erscheinung beschränken. Aus den bisher bekannten Fluoreszenzerscheinungen beim Neutralrot kämen drei Möglichkeiten in

Frage, entweder reichert sich eine der papierchromatographisch festgestellten Komponenten unter der Strahlenwirkung im Zellsaft an, oder in der Vakuole wird durch die Strahlenwirkung eine neutrale hydrophobe Phase frei, die die Farbbase speichert, oder der Farbstoff wird in der Zelle reduziert.

#### a) Färbungsversuche mit den isolierten Komponenten des Neutralrots

Im zweidimensionalen Papierchromatogramm konnten zwei und bei Neutralrot extra (Grübler) sogar drei fluoreszierende Komponenten nachgewiesen werden. Da Trennungsversuche mit Aluminiumoxyd fehlschlagen, wurden die einzelnen Komponenten mit Alkohol aus den Papierchromatogrammen von Neutralrot extra (Grübler) eluiert und nach Verdampfung des Alkohols der Rückstand mit Leitungswasser aufgenommen. Mit den so erhaltenen Lösungen wurden dann an den O.E. Vitalfärbungen durchgeführt.

Mit der roten Hauptkomponente, die im zweidimensionalen Papierchromatogramm nicht weiter zerlegt wird, lassen sich die gleichen Vitalfärbungen durchführen wie mit einer normalen Neutralrotlösung. Die Vakuolen der O. E.-Zellen färben sich zinnoberrötlich mit Vakuolenkontraktion, und im Blaulicht fluoresziert das Plasma leuchtend gelb. Durch die Strahlenwirkung schlägt die Plasmafluoreszenz nach Gelbgrün um, und die Vakuole beginnt gelbgrün zu fluoreszieren.

Mit den anderen Komponenten konnte auch nach dreistündiger Einwirkung keine im Hellfeld wahrnehmbare Färbung erzielt werden. Im Blaulicht bedingte die goldgelb fluoreszierende Komponente eine diffuse gelbgrüne Plasmafluoreszenz, die zitronengelbe Komponente eine sehr schwach diffuse Fluoreszenz der ganzen Epidermis und die nur beim Neutralrot extra (Grübler) auftretende grüne Komponente gar keine Fluoreszenz. Hier handelte es sich aber auch nur um sehr geringe Farbstoffkonzentrationen.

Aus diesen Ergebnissen können wir schließen, daß die Fluoreszenzerscheinungen an der lebenden Zelle durch die rote Hauptkomponente bedingt werden, die in vitro die geringste Fluoreszenz zeigt. Die im Papierchromatogramm zutage tretenden stärker fluoreszierenden Komponenten scheinen — jedenfalls der Zelle von außen geboten — dafür keine oder nur eine geringere Bedeutung zu haben.

#### b) Versuche mit $\text{NH}_4\text{OH}$

Wenn wir die Möglichkeit einer Speicherung der Farbbase in hydrophoben Phasen des Zellsaftes ins Auge fassen, müßte durch Zugabe von  $\text{NH}_4\text{OH}$  zu den gefärbten Zellen eine Fluoreszenzsteigerung zu erzielen sein.  $\text{NH}_4\text{OH}$  dringt leicht in die Zelle ein und bedingt eine  $\text{pH}$ -Verschiebung zur alkalischen Seite, so daß aus dem von der Zelle gespeicherten Farbstoff die Farbbase in Freiheit gesetzt werden muß.

Bringt man bei einem bereits bestrahlten Präparat mit intensiver grüner Plasma- und Zellsaftfluoreszenz seitlich an das Deckglas einen Tropfen  $\text{NH}_4\text{OH}$ , so schlägt fortschreitend mit der  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Diffusion die Plasmafluoreszenz in ein intensives Goldgelb um, und die grüne Zellsaftfluoreszenz verschwindet. Der Farbstoff fällt in der Vakuole als schwer wasserlösliche Farbbase in Kristallform aus.

Es soll noch erwähnt werden, daß bei Übertragung von O.E., deren Vakuolen mit Neutralrot gefärbt sind, in  $n/100 \text{ NH}_3$  im Hellfeld eine Entfärbung des Zellsaftes zu beobachten ist und der Farbstoff jetzt mit hochrotem Farbton von der Membran aufgenommen wird. Auf diese merkwürdige Erscheinung hat erstmalig Höfler (1947 b) für Zellen hingewiesen, die mit Acridinorange vitalgefärbt waren. An Zellen, die eine starke Vakuolenkontraktion aufweisen, kann man sehr gut beobachten, daß diese Membranfärbung zuerst in der Mitte der Längswände beginnt, dort, wo zwischen Vakuole und Zellwand nur ein ganz dünner Plasmaschlauch vorhanden sein kann. Am längsten bleiben die Bezirke der Zellwände farblos, die in den Zellzwickeln dem Plasma angrenzen. Dieselbe Erscheinung — nur langsamer — tritt auch in  $n/1000 \text{ NH}_3$  auf, häufig kommt es hier allerdings nicht mehr zu einer völligen Entfärbung der Vakuole. Auffallend ist auch, daß absterbende Kerne und Plasma sich in  $n/100 \text{ NH}_3$  ebenfalls mit dem aus der Vakuole austretenden Farbstoff hochrot anfärben. In höheren  $\text{NH}_3$ -Konzentrationen unterbleibt die Membranfärbung, und der Farbstoff scheint in Kristallform aus den Membranen auszublühen.

Werden die O.E. mit Membranfärbung aus den  $n/100$  bzw.  $n/1000 \text{ NH}_3$ -Lösungen in farbloses Leitungswasser übertragen, so entfärben sich wieder die Membranen und die Vakuolen speichern den Farbstoff, wie es auch bereits von Höfler für Acridinorange festgestellt worden ist. Die Zellen verhalten sich also so, als ob sie von einem sauren Milieu in ein alkalisches überführt worden wären (Strugger 1936). Durch die  $\text{NH}_3$ -Aufnahme wird der Zellsaft alkalisch, was zu einer Entfärbung führen muß, entsprechend dem früher von Drawert (1948, Abb. 1) gegebenen Schema. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß  $\text{NH}_3$  über die Außenkonzentration hinaus aufgenommen wird, so daß der Zellsaft alkalischer reagiert als das Außenmedium. Ferner muß man bedenken, daß es sich bei den benutzten  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösungen um nur schwach gepufferte Systeme handelt. Ebenso dürften die mit Neutralrot zinnoberrot gefärbten Zellen nur einen schwach gepufferten Zellsaft besitzen zum Unterschied von violett gefärbten, wodurch sich ihre leichte Beeinflussbarkeit durch  $\text{NH}_3$  erklären würde. Nach Übertragung der Zellen in reines Leitungswasser wandert das  $\text{NH}_3$  wieder aus den Zellen aus, so daß der Zellsaft saurer wird als das umgebende Medium, was entsprechend unseren Vorstellungen vom Mechanismus der Farbstoffverteilung in der Zelle zu einer Vakuolenfärbung führen muß (Drawert 1948, 1956). Doch soll auf diesen ganzen Fragenkomplex, der auch die Unterscheidung „voller“ und „leerer“ Zellsäfte (Höfler 1947 a, b) berührt, hier nicht näher eingegangen werden.

## c) Versuche über einen Einfluß der Sauerstoffspannung

Treten durch Reduktion des Farbstoffes in der Zelle Fluoreszenzerscheinungen auf, so können diese durch Sauerstoffmangel gefördert und durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gelöscht werden, wie an Vitalfärbungsversuchen mit Redoxindikatoren, z. B. Janusgrün B, gezeigt werden konnte (Drawert 1953). Auf die Neutralrotfluoreszenz hat aber ein Vaselineabschluß des Deckglases keinen Einfluß. Nur im Hellfeld ist zu beobachten, daß entsprechend den Befunden von Strugger (1936) eine Vakuolenfärbung bei Deckglasabschluß allmählich in eine Membranfärbung übergeht. Dies ändert aber nichts daran, daß erst durch eine Bestrahlung eine gelbgrüne Vakuolenfluoreszenz ausgelöst werden kann, gleichgültig, ob der Farbstoff nach dem Hellfeldbild noch in der Vakuole lokalisiert ist oder schon in die Membran gewandert ist, und gleichgültig, ob die Bestrahlung am frisch hergerichteten Präparat durchgeführt wird oder an einem Präparat, das sich schon 24 Stunden unter einem Vaselineabschluß befindet.

Diesen Ergebnissen entsprechend hat auch die Zugabe von 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  keinen Einfluß auf bereits vorhandene Fluoreszenzerscheinungen oder deren Auslösung durch die Bestrahlung.

d) Vitalfärbungen mit reduziertem Neutralrot<sup>1</sup>

Aus den im vorhergehenden Abschnitt mitgeteilten Befunden müssen wir schließen, daß bei den Fluorochromierungen mit Neutralrot Reduktionsvorgängen entsprechend der früher ausgesprochenen Vermutung kaum eine Bedeutung zukommt. Es war aber trotzdem von Interesse zu prüfen, wie Vitalfärbungen mit reduziertem bzw. teilweise reduziertem Neutralrot ausfallen, da reduzierte Neutralrotlösung stark grünlich fluoresziert. Bei völliger Reduktion ist die Fluoreszenz am schwächsten, nimmt dann aber mit der Reoxydation wieder zu.

Die Reduktion wurde mit Rongalit C oder mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  durchgeführt. Die Lösungen 1:10.000 bleiben gelblich und die 1:1000-Lösungen nehmen nach Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  einen olivgrünlichen Ton im normalen Licht an. In kurzer Zeit kehrt in offenen Gefäßen an der Luft der rote Farbton durch Reoxydation wieder zurück.

Mit frisch reduzierten Lösungen, die allerdings während der Versuchsdurchführung bereits wieder reoxydieren, erhält man bei  $\text{pH} \sim 7$  in den O. E. von vornherein eine sehr intensive grüngelbe Zellsaftfluoreszenz. Unter der Strahlenwirkung beginnt dann auch das Plasma sehr stark grüngelb zu leuchten.

Reduzierte Lösungen, die 24 Stunden der Luft ausgesetzt waren und dann mit Phosphatpuffer soweit verdünnt wurden, daß die Farbstoffkonzentration 1:10.000 betrug, fluoreszierten orange. Die Fluoreszenzintensität war bei  $\text{pH} 2$  am schwächsten, von  $\text{pH} 3-6$  gleichmäßig gut und bei  $\text{pH} 7$  am stärksten. Die mit diesen Lösungen an O. E.-Zellen durchgeführten Vitalfärbungen ergaben folgende Ergebnisse:

<sup>1</sup> Anmerkung bei der Korrektur: Auf die während der Drucklegung vorliegende Mitteilung erschienene Arbeit von Kiermayer, O.: Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Fluoreszent X (reduziertem Neutralrot), Protoplasma 46, 437 (1956), kann hier nur verwiesen werden.

pH 2: Zellen starben während der Versuchszeit ab.

pH 3: Im Hellfeld sind die Membranen rot gefärbt. Im Blaulicht fluoreszieren Plasma und Kern grüngelb. Unter der Strahlenwirkung nimmt die Fluoreszenzintensität zu.

pH 4: Im Hellfeld ist nur eine reine Membranfärbung zu beobachten. Im Blaulicht fluoreszieren Plasma und Kerne. Unter der Strahlenwirkung beginnen aber auch die Vakuolen schwach gelbgrün zu fluoreszieren, Plasma- und Kernfluoreszenz wird bedeutend intensiver.

pH 5: Die Epidermen verhalten sich wie bei pH 4.

pH 6: Im Hellfeld zeigen die O. E.-Zellen noch reine Membranfärbung. Im Blaulicht zeichnen sich die Vakuolen von vornherein durch eine sehr intensive grüngelbe Vakuolenfluoreszenz aus.

pH 7: Im Hellfeld weisen die Zellen eine zinnoberrote Vakuolenfärbung mit Vakuolenkontraktion auf. Im Blaulicht leuchten die Vakuolen intensiv grüngelb. Plasma und Kern scheinen wie bei pH 6 zunächst ohne Fluoreszenz zu sein, beginnen aber unter der Strahlenwirkung hellgrüngelb zu fluoreszieren.

Bei der Anwendung einer mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  behandelten Neutralrotlösung, die einige Tage der Luftfeuchtigkeit ausgesetzt war, in einer Konzentration von 1:10.000 in L. W., zeigen die O. E.-Zellen im Hellfeld eine zinnoberrote Zellsaftfärbung mit Vakuolenkontraktion. Im Blaulicht fluoresziert jetzt aber nur das Plasma grünlich und wird bei der Bestrahlung nach kürzester Zeit intensiv gelbgrün. Die Vakuole fluoresziert nicht und scheint auch unter der Strahlenwirkung keine Fluoreszenz anzunehmen. Bei der sehr intensiven Plasmafluoreszenz ist es allerdings häufig schwer zu entscheiden, ob der Zellsaft auch noch eine grünliche Fluoreszenz annimmt. Diese Entscheidung wird noch dadurch erschwert, daß sich das ganze Gesichtsfeld unter der Strahlenwirkung mit einem grünen Schleier überzieht.

#### e) Versuche zum Nachweis einer Strahlenwirkung auf Neutralrotlösungen

Da allem Anschein nach Reduktionsprozesse nicht für das Auftreten einer Vakuolenfluoreszenz in den O. E. nach einer Vitalfärbung mit Neutralrot und Bestrahlung verantwortlich zu machen sind, muß noch einer anderen Erscheinung nachgegangen werden. Es wurde in den vorhergehenden Abschnitten schon mehrmals darauf hingewiesen, daß in plasmolysierten Zellen auch im extraplasmatischen Raum unter der Strahlenwirkung eine grüngelbe Fluoreszenz auftritt oder daß besonders bei den dickeren Objekten, wie U. E.-Schnitten von *Allium*- oder *Helodea*-Blättchen, das ganze Gesichtsfeld sich während der Beobachtung allmählich mit einem grünen Schleier überzieht. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß während der Bestrahlung Stoffe, die aus der Zelle austreten, oder das Neutralrot selber ohne Mitwirkung der lebenden Zelle verändert werden.

Zwischen Objektträger und Deckglas gebrachter Preßsaft aus Zwiebeln läßt im Fluoreszenzmikroskop keine Fluoreszenz erkennen. Daran ändert sich auch nach längerer Bestrahlung nichts. Wird dem Zwiebelsaft aber etwas Neutralrot zugesetzt, so beginnt schon nach kurzer Bestrahlungszeit die Lösung in dem von den Strahlen getroffenen Teil gelbgrün zu fluoreszieren. Dasselbe ist auch bei reiner Neutralrotlösung der Fall.

Daraufhin brachten wir Neutralrotlösungen 1:10.000 in dest. Wasser in einer Küvette für 35–40 Min. in den Strahlengang des Fluoreszenzmikroskops zwischen Quecksilberdampf Lampe und U.V.- bzw. Blaufilter. Da die Lösung sich durch die Bestrahlung beträchtlich erwärmte, wurde zur Kontrolle ein Teil der Neutralrotlösung ohne Bestrahlung erwärmt. Durch stärkere Erwärmung können in Farbstofflösungen Zersetzungen auftreten, die sich auf die Vitalfärbung auswirken, wie es z. B. vom Nilblau bekannt ist (Gutz 1956). Unter der Strahlenwirkung beginnt

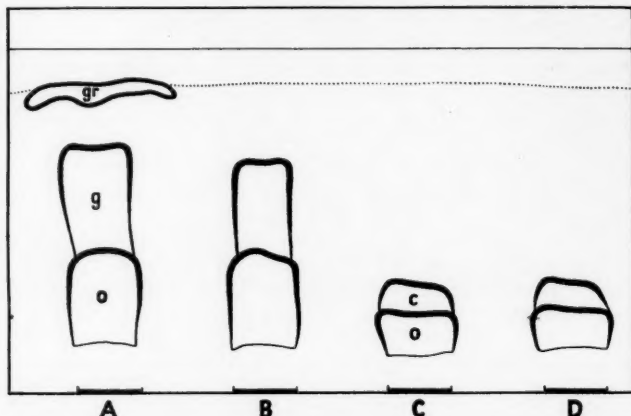


Abb. 3. Eindimensionales Papierchromatogramm von Neutralrot extra (Grübler) mit Aceton + Leitungswasser (4:6) entwickelt. A = mit der Quecksilberhöchst- drucklampe bestrahlte Lösung 1:10.000 in dest. Wasser. B = nur erwärmte Lösung. C = bestrahlte Lösung 1:10.000 mit pH 2. D = nur erwärmte Lösung mit pH 2. Der zur Abszisse parallele Strich gibt die Frontlinie des aufgestiegenen Entwicklers an, die darunter befindliche gestrichelte Linie die untere Grenze des schwach bläulichweiß fluoreszierenden Streifens der Lösungsmittelfront. Fluoreszenztöne: o = orange, g = gelborange, gr = grün, c = cyclamenrot.

die Neutralrotlösung intensiv orangegelb zu fluoreszieren. Die unbestrahlte, nur erwärmte Lösung zeigt nicht diese Fluoreszenz. Außer der Fluoreszenz ist an den Lösungen der Präparate von Bayer und Grübler weiter keine Veränderung wahrzunehmen, während die Lösung des Präparates von Merck zum größten Teil durch die Bestrahlung ausgefällt wird; die nur erwärmte Lösung bleibt auch in diesem Fall klar.

In Vitalfärbungsversuchen unterscheiden sich die bestrahlten Lösungen in ihrem Verhalten nicht von den unbestrahlten. Die grüngelbe Zellsaftfluoreszenz tritt auch hier erst während der Beobachtung auf.

Im eindimensionalen Papierchromatogramm kann aber in der bestrahlten Lösung eine rasch wandernde, grün fluoreszierende Komponente nachgewiesen werden (Abb. 3). Wird die Farbstofflösung bis auf pH 2 angesäuert, tritt nach



der Bestrahlung keine Fluoreszenz der Lösung auf, und im Papierchromatogramm läßt sich auch keine grün fluoreszierende Komponente nachweisen. Ferner fehlt auch in der unbestrahlten Lösung mit pH 2 die gelborange fluoreszierende Fahne (Abb. 3). Die grün fluoreszierende Komponente in der Farbstofflösung in dest. Wasser erhält man auch nach einer einstündigen Bestrahlung mit einer Kohlenbogenlampe.

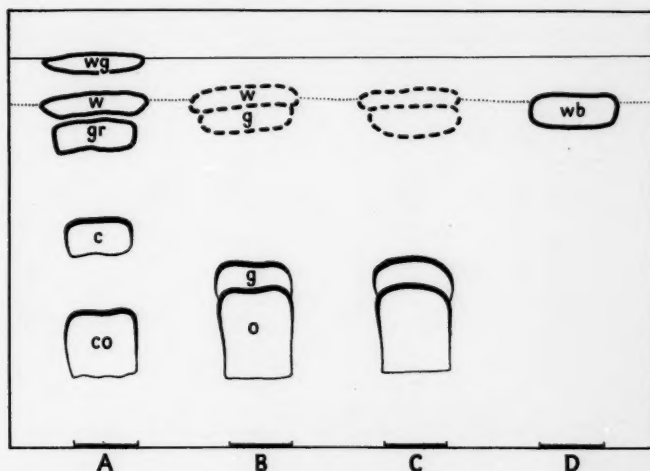


Abb. 4. Eindimensionales Papierchromatogramm von Neutralrot extra (Grübler), das zuerst mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert wurde und dann an der Luft reoxydierte. Entwicklung mit Aceton + Leitungswasser (4 : 6). A = mit der Quecksilberhöchstdrucklampe bestrahlte Lösung. B = erwärmte und C = nicht erwärmte Lösung. D =  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung. Der zur Abszisse parallele Strich gibt die Frontlinie des aufgestiegenen Entwicklers an, die darunter befindliche gestrichelte Linie die untere Grenze des schwach bläulichweiß fluoreszierenden Streifens der Lösungsmittelfront. Fluoreszenztöne: co = cyclamenorange, c = cyclamenrot, gr = grün, w = weißgrünlich, wg = weißgelblich, wb = bläulichweiß, g = gelb, o = orange.

Im Elektrophoreseversuch mit 120 V und 1–2 mA auf Filtrierpapier bei pH 6 wandert die grün fluoreszierende Komponente der bestrahlten Lösung eindeutig zur Anode. Ebenso ist bei pH 8,5 und pH 4,4 der Durchtränkungsflüssigkeit eine sehr gute Wanderung der grünen Komponente zu beobachten, während bei pH 3 nur eine zart grünlich leuchtende, zur Anode gerichtete Fahne wahrzunehmen ist. Bei pH 2 ist auch nach 15 Stunden Versuchsdauer keine Wanderung einer grünen Komponente zu erkennen. Die im Hellfeld rote Phase wandert zur Kathode. Der am Start liegenbleibende Fleck fluoresziert mit Ausnahme von pH 2 intensiv orange. In der unbestrahlten, normalen oder erwärmten Lösung ist auch durch Elektrophorese keine grün fluoreszierende Komponente nachzuweisen.



Aus den Elektrophoreseversuchen geht hervor, daß der basische, also positiv geladene Farbstoff Neutralrot, wenn er nicht im völlig dissoziierten Zustand (pH 2) vorliegt, unter der Strahlenwirkung einer Quecksilberhöchst- oder Kohlenbogenlampe eine grün fluoreszierende, negativ geladene Komponente abspaltet.

Im Zusammenhang mit dem von Clark und Perkins (1932) nach Reduktion und Reoxydation einer Neutralrotlösung gefundenen „Fluoreszent X“ war es noch von Interesse, eine entsprechende Farbstofflösung vor und nach der Bestrahlung papierchromatographisch und elektrophore-

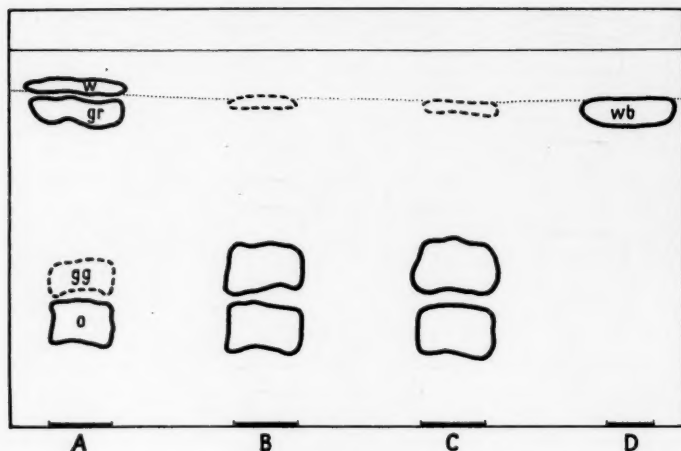


Abb. 5. Wie Abb. 4, nur Neutralrot (Merck), gg = gelbgrün. Die anderen Farbtonangaben siehe Abb. 4.

tisch zu untersuchen. Es wurden dazu Farbstofflösungen 1 : 1000 in dest. Wasser mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert und nach 24- bis 48stündigem oder auch noch längerem Stehen an der Luft nach einer Verdünnung auf 1 : 10.000 mit dest. Wasser für die Versuche benutzt. Es sollen hier nur rein informatorisch einige Ergebnisse mitgeteilt werden.

Die Lösungen waren ganz normal rot gefärbt und unterschieden sich von direkt hergestellten Lösungen nur durch ihre Fluoreszenz, die schon im auffallenden Tageslicht in Erscheinung trat. Ein Teil der Lösung wurde, wie auf S. 374 angegeben, bestrahlt, ein Teil nur erwärmt und ein dritter Teil nicht weiter behandelt. In Abb. 4 ist ein mit Neutralrot extra (Grübler) erhaltenes eindimensionales Papierchromatogramm wiedergegeben. Erwärmte und nicht erwärmte Lösungen verhalten sich gleich. Einer orange fluoreszierenden Komponente mit  $R_f \sim 0,35$  sitzt eine gelb fluoreszierende mit  $R_f \sim 0,44$  auf. Das zur Entwicklung benutzte Aceton-Wasser-Gemisch bildet an der Lösungsmittelfront einen 10 bis 15 mm breiten, zart bläulich-weiß fluoreszierenden Streifen. Eine zur Kontrolle mitgelaufene  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -

Lösung weist nur an der unteren Grenze des Lösungsmittelstreifens einen schwach bläulichweiß fluoreszierenden Fleck auf. In derselben Höhe zeigen auch die Chromatogramme der nicht bestrahlten reoxydierten Neutralrotlösungen eine zart fluoreszierende Stelle, die aber nach der Lösungsmittelfront zu einen weißgrünlichen und nach dem Start zu einen gelblichen Farbton besitzt. Die bestrahlte Lösung kann dagegen in fünf ganz distinkte Komponenten zerlegt werden: eine cyclamenrot-orange fluoreszierende mit  $R_f \sim 0,31$ , eine cyclamenrote mit  $R_f \sim 0,55$ , eine grüne mit  $R_f \sim 0,8$ , eine weißgrüne mit  $R_f \sim 0,87$  und einen in der obersten Grenze der Lösungsmit-

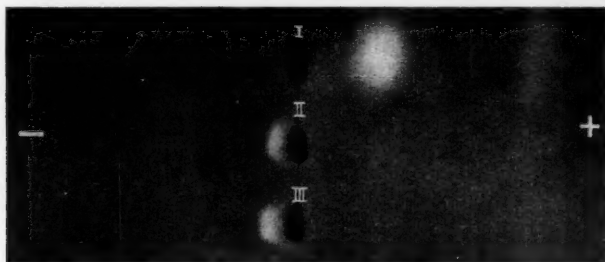


Abb. 6. Elektrophorese von Neutralrot extra (Grübler), das zuerst mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert wurde und dann an der Luft reoxydierte. I = bestrahlte Lösung, II = nur erwärmte Lösung, III = nicht erwärmte, unbestrahlte Lösung. Nähere Erklärung im Text.

telfront liegenden weißgelben Strich mit  $R_f \sim 0,98$ . Die angegebenen Farbtöne beziehen sich auf die Fluoreszenz der Flecke, die z. T. nur im U. V. wahrzunehmen sind.

Wie Abb. 5 wiedergibt, verhält sich die reoxydierte Lösung des Neutralrotpräparates von Merck etwas anders. Zum Unterschied von der nicht reduzierten Lösung treten bei der reoxydierten Lösung durch die Bestrahlung keine Ausfällungen auf. In der gekochten unbestrahlten, reoxydierten Lösung des Präparates von Bayer kommt noch eine weißgrün fluoreszierende Komponente in der Höhe der cyclamenrot leuchtenden der bestrahlten Lösung zum Vorschein.

Im Elektrophoreseversuch mit der reoxydierten Lösung von Neutralrot extra (Grübler) bei pH 5,4 wandert in den unbestrahlten Lösungen eine intensiv gelb fluoreszierende Komponente zur Kathode. Bei der bestrahlten Lösung ist diese Komponente nicht mehr nachweisbar, dafür wandert aber eine intensiv grün fluoreszierende Komponente zur Anode (Abb. 6), darüber befindet sich noch weiter zur Anode ein schwächer gelbgrün fluoreszierender Fleck. Auf derselben Höhe ist bei den nicht bestrahlten Lösungen auch eine ganz zarte Fluoreszenz angedeutet.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung zeigt nur eine ganz schwach bläulichweiß fluoreszierende Komponente, die zur Kathode wandert.

## VI. Besprechung der Ergebnisse

Aus den Vitalfärbungsversuchen geht hervor, daß das Plasma der neutralrot-gefärbten Zellen unter der Strahlenwirkung des Erregerlichtes einen bisher nur wenig beachteten Farbtonwechsel in der Fluoreszenz zeigt. Am Anfang der Beobachtung fluoresziert das Plasma im Blaulicht mit Sperrfiltern der OG-Gruppe goldgelb bis orange und nimmt dann erst unter der Strahlenwirkung — allerdings meist in kürzester Zeit — die in der Literatur beschriebene grüngelbe Fluoreszenz an. Bei U. V. und etwa dem Sperrfilter U. V. 2,5 leuchtet das Plasma zunächst bläulichweiß bis silbrig und geht dann zu einer grünen Fluoreszenz über. Toth (1952) muß mit sehr energiearmem U. V. gearbeitet haben, da sie das Plasma der O. E. immer als silbrig bis grüngelb beschreibt, erst nach 20 Min. dauernder Bestrahlung verfärbte „sich das Plasma mehr nach Gelb“. Für die U. E. gibt Toth gar keine Veränderung unter der Strahlenwirkung an. Das scheint für die Vakuole, die Toth in erster Linie betrachtet, auch zuzutreffen, andererseits nehmen aber das Plasma und die Membranen der U. E. in kürzester Zeit eine derartig intensive grüne bis gelbe (je nach benutztem Sperrfilter) Fluoreszenz an, daß manchmal die rote Zellsaftfluoreszenz förmlich überstrahlt wird.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Nachweis, daß auch in O. E. mit reiner Membranfärbung durch die Bestrahlung eine grüngelbe Vakuolenfluoreszenz ausgelöst werden kann. Diese Erscheinung steht mit der Annahme von Strugger (1940), daß auch im sauren Bereich aus der gebotenen Farbstofflösung geringe Spuren des Farbstoffes durch den Zellsaftsraum aufgenommen werden, in gutem Einklang. Der Befund ist aber unvereinbar mit der Vorstellung von Kölbel (1948) über das Zustandekommen der Vakuolenfluoreszenz.

Kölbel nimmt an, daß der Farbstoff im Zellsaft in gebundenem Zustand vorliegt, und infolge einer durch die Bestrahlung „verursachten physiologischen ‚Umstimmung‘ des Zellsaftes ... wird der Farbstoff aus seiner Bindung in Freiheit gesetzt und wandert allmählich aus der Vakuole aus. Hiermit muß sich auch die konzentrationsabhängige Fluoreszenzfarbe ändern“. Mit abnehmender Konzentration des Neutralrots soll dann auf Grund des von Kölbel angenommenen Konzentrationseffekts die gelbgrüne Zellsaftfluoreszenz auftreten. Träfe diese Auffassung zu, dann müßte bei einem bestimmten pH-Wert unterhalb der im sichtbaren Licht wahrnehmbaren Vakuolenfärbung von vornherein eine intensive Vakuolenfluoreszenz zu beobachten sein. Das ist aber nicht der Fall, sondern die Vakuolenfluoreszenz tritt in der O. E. unter der Strahlenwirkung um so schneller ein, je mehr wir uns im Außen-pH dem Wert nähern, bei dem auch im Hellfeld eine Vakuolenfärbung zu erkennen ist, d. h. aber, je mehr Farbstoff in der Vakuole vorhanden sein muß.

Ebenso wird sich die Auffassung von Kölbel, daß die Plasmafluoreszenz auf einer Kationenadsorption beruhen soll, kaum aufrechterhalten lassen. Die Vermutung von Strugger, daß es sich um eine Lösung der

Farbbase in einer lipoiden Phase des Plasmas handelt, ist auf Grund unserer Kenntnisse der Eigenschaften des Neutralrots und der Vitalfärbung des Plasmas mit anderen Farbstoffen viel wahrscheinlicher. So gibt nach Spek (1951) mit Safraninen vitalgefärbtes tierisches Plasma ein Spektrum, das mit dem einer Safraninlösung in Phosphatiden übereinstimmt. Erst bei einer Schädigung der Zelle werden auch Adsorptionsbanden sichtbar, die für eine wässrige Safraninlösung charakteristisch sind. Dies dürfte so zu deuten sein, daß sich jetzt auch hydrophile Substanzen (wohl Eiweißkörper) färben. Ferner sprechen die mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  erhaltenen Befunde gegen die Vorstellung von Kölbel, worauf bereits an anderer Stelle hingewiesen worden ist (Drawert 1956). Durch die künstliche Alkalinisierung des Plasmas wird keine Fluoreszenzlöschung, sondern im Gegenteil eine Verstärkung erreicht. Nach der Hypothese von Kölbel müßte eine Löschung eintreten, da jetzt ja die Dissoziation des Farbstoffes zurückgedrängt wird, so daß es zu keiner Kationenadsorption mehr kommen kann.

Wir dürfen auch pflanzliches und tierisches Plasma in ihrem Verhalten den Farbstoffen gegenüber nicht so ohne weiteres gleichsetzen, wie es Kölbel tut. Wie bereits mehrmals betont wurde (Drawert 1948, 1956), müssen wir bei der Vitalfärbung des tierischen Plasmas streng zwischen einer Diffusfärbung und einer Granulafärbung unterscheiden. Nur den ersten Färbungstyp dürfen wir mit einer Plasmafärbung der Pflanzenzelle vergleichen, die Granulafärbung ist vielmehr eine Parallele zur Vakuolenfärbung. Bei einer intensiven Färbung von lebendem tierischen Plasma mit Neutralrot handelt es sich aber vorwiegend — wenn nicht nur — um eine Granulafärbung. Es liegt also ein ganz anderer Lokalisationsort und auch ein ganz anderer Färbungsmechanismus vor. Bei der weiter oben angeführten Safraninfärbung tierischen Plasmas muß es sich dagegen um eine Diffusfärbung handeln; denn Spek schreibt (1951, S. 246): Die noch voll vitalen Eier „waren alle gleichmäßig blaßrosa gefärbt“.

Durch die Entdeckung einer grün fluoreszierenden Komponente, die aus dem Neutralrot unter der Strahlenwirkung des Erregerlichtes entsteht, dürfte jetzt eine kausale Erklärung der von Strugger in den O.E. von *Allium* aufgefundenen sekundären Vakuolenfluoreszenz möglich sein. Da die Ausbildung der grün fluoreszierenden Komponente durch die wirksamen Strahlen um so schwerer erfolgt, je saurer die Lösung ist und sie bei pH 2 ganz unterbleibt, dürfen wir wohl annehmen, daß die Farbbase und nicht das dissoziierte Farbsalz der Ausgangsstoff ist. Dafür spricht auch das sehr schnelle Auftreten der gelbgrünen Fluoreszenz im Plasma der vitalgefärbten Zellen, denn aus der vor der Strahlenwirkung vorhandenen Plasmafluoreszenz und ihrer Verstärkung durch  $\text{NH}_4\text{OH}$  müssen wir schließen, daß der Farbstoff als Farbbase vorliegt, die wahrscheinlich in den Plasma-lipoiden gelöst ist.

Sobald im Zellsaft Farbbasenmoleküle vorhanden sind, wird durch eine Zersetzung derselben bei der Bestrahlung allmählich eine grüngelbe bis grüne Vakuolenfluoreszenz sichtbar, und zwar muß die Fluoreszenz um so rascher sich einstellen und um so intensiver sein, je mehr Farbbasenmole-

küle der Zellsaft enthält. Dies trifft auch tatsächlich zu, denn wir erhalten die Zellsaftfluoreszenz um so schneller und intensiver, je niedriger die  $cH$  der gebotenen Farbstofflösung ist und je mehr der Farbton des gespeicherten Neutralrots im Hellfeld auf eine niedrige  $cH$  des Zellsaftes hindeutet. In den U. E. von *Allium* mit den im Hellfeld violett gefärbten Vakuolen kann ebensowenig wie in einer Neutralrotlösung mit  $pH\ 2$  eine Fluoreszenz durch Bestrahlung ausgelöst werden. — Ganz anders verhält sich aber das Plasma der U. E. — Aus dieser Parallele könnte man schließen, daß das Neutralrot in der U. E. im Zellsaft in einer stark sauren wässrigen Phase gelöst gespeichert wird. Doch müssen wir mit solchen Schlüssen äußerst vorsichtig sein, da wir über den Zustand des Farbstoffes in der Zelle noch gar nichts wissen, so daß wir aus dem Farbton nicht ohne weiteres auf den  $pH$ -Wert des Zellsaftes schließen können. Doch soll auf diese Frage hier nicht näher eingegangen und nur auf Ausführungen an anderer Stelle verwiesen werden (Drawert 1955 b). Immerhin ist die erwähnte Parallele von großem Interesse und kann uns vielleicht zu einer besseren Einsicht in die Verhältnisse, wie sie in der Zelle vorliegen, führen.

Aus den Versuchen mit reduzierten und wieder reoxydierten Neutralrotlösungen geht ferner hervor, daß die grün fluoreszierende Komponente nicht identisch sein kann mit dem „Fluoreszent X“ von Clark und Perkins (1932). In den reoxydierten Lösungen wandert eine fluoreszierende Komponente zur Kathode, während in den bestrahlten Lösungen die fluoreszierende Phase zur Anode wandert. Andererseits scheint aber zwischen beiden fluoreszierenden Komponenten doch eine Beziehung zu bestehen, da in den bestrahlten reoxydierten Lösungen die zur Kathode wandernde fluoreszierende Komponente etwa in dem Maße verschwindet, wie die zur Anode wandernde entsteht. Versuche zur Klärung dieser Fragen sind in Angriff genommen.

Für Speicherungs- und Permeabilitätsfragen ist es von besonderem Interesse, daß die durch die Bestrahlung entstehende, grün fluoreszierende Komponente entgegengesetzt geladen ist wie der Farbstoff selber. Falls die aus den Modellversuchen geschlossene Erklärung der sekundären Vakuolenfluoreszenz zutrifft — was doch sehr wahrscheinlich ist —, hätten wir jetzt die Möglichkeit, einen von der Zelle aufgenommenen basischen — also kationischen — Farbstoff durch Bestrahlung in der lebenden Zelle in einen sauren — also anionischen — umzuwandeln.

Die hier und auch schon früher mitgeteilten Befunde sind aber auch eine Warnung vor zu schnellen Schlußfolgerungen aus fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen. Die chemische Wirksamkeit der Strahlen führt, auch bei kurzen Beobachtungszeiten, nicht nur zu einer Änderung zelleigener Substanzen (Drawert 1952), sondern kann auch, wie das vorliegende Beispiel des Neutralrots zeigt, zu einer Änderung der benutzten Fluorochrome führen. Diese Gefahr wird um so größer, je mehr wir zur Verbesserung des Fluoreszenzbildes zu immer energiereicheren Erregerlichtquellen greifen.

### Zusammenfassung

In den Oberepidermiszellen (O. E.) der Schuppenblätter von *Allium cepa* weist das Plasma nach einer Vitalfärbung der Zellen mit Neutralrot, sobald es zum erstenmal vom Erregerlicht getroffen wird, bei der Verwendung von OG-Sperrfiltern eine goldgelbe Fluoreszenz auf. Unter der Strahlenwirkung schlägt diese Fluoreszenz nach Grüngelb um.

Die in der Literatur vorhandenen Angaben, daß mit Neutralrot vitalgefärbte O. E.-Zellen mit zinnoberrotem Zellsaft unter dem Einfluß des Erregerlichtes eine gelbgrüne Zellsaftfluoreszenz erhalten, kann bestätigt werden. Diese Zellsaftfluoreszenz tritt aber auch bei Epidermen auf, die im Hellfeld nur eine reine Membranfärbung zeigen.

Entsprechend den Angaben in der Literatur besitzen die mit Neutralrot violett gefärbten Zellsäfte der Unterepidermis (U. E.) der Schuppenblätter von *Allium cepa* bei der Benutzung entsprechender Sperrfilter eine rote Zellsaftfluoreszenz, die sich unter der Strahlenwirkung nicht zu ändern scheint. Plasma und Zellwände der U. E. beginnen aber während der Bestrahlung z. T. derartig intensiv grün bis gelb zu leuchten, daß u. U. die rote Zellsaftfluoreszenz überstrahlt wird.

Die Schleimzellen in den Blättern von *Helodea densa* können mit Neutralrot elektiv goldgelb fluorochromiert werden (nur im Blaulicht mit OG-Sperrfiltern zu erkennen). Unter der Strahlenwirkung schlägt auch hier der Farbton des ausgestrahlten Lichtes nach Grüngelb um.

Im Papierchromatogramm lassen sich in Neutralrotlösungen bis zu vier mehr oder weniger stark fluoreszierende Komponenten nachweisen. Bei Bestrahlung einer Neutralrotlösung mit einer Kohlenbogen- oder Quecksilberhöchstdrucklampe entsteht eine weitere intensiv grün fluoreszierende Komponente, die im Elektrophoreseversuch zur Anode wandert. Neutralrot selber wandert als basischer Farbstoff im dissoziierten Zustand zur Kathode. Nach der Bestrahlung einer völlig dissoziierten Neutralrotlösung bei pH 2 kann keine grün fluoreszierende Komponente nachgewiesen werden.

Die in der Literatur zu findende Angabe, daß nach langsamer Reoxydation einer reduzierten Neutralrotlösung neben dem zurückgebildeten roten Farbstoff eine stabilere, fluoreszierende Verbindung erhalten bleibt, kann bestätigt werden. Diese wandert aber zur Kathode, kann also nicht mit der nach einer Bestrahlung erhaltenen grün fluoreszierenden Komponente identisch sein. Wird allerdings eine reoxydierte Neutralrotlösung bestrahlt, so verschwindet die zur Kathode wandernde Komponente in dem Maße, wie die zur Anode wandernde gebildet wird.

Aus den Ergebnissen der Neutralrotversuche in vitro wird geschlossen, daß auch die in der lebenden Zelle nach einer Vitalfärbung mit Neutralrot unter der Strahlenwirkung des Erregerlichtes zu beobachtende Änderung der Fluoreszenzfarbtöne und die Entstehung einer gelbgrünen Vakuolenfluoreszenz auf die sich bildende grün fluoreszierende Komponente zurückzuführen sind. Damit wäre eine Möglichkeit gegeben, einen von der lebenden Zelle aufgenommenen basischen (kationischen) Farbstoff in der Zelle durch die Bestrahlung in einen sauren (anionischen) zu verwandeln.



Auf die Bedeutung der chemischen Wirkung des Erregerlichtes für die Fluoreszenzmikroskopie und besonders für die Erklärung der erhaltenen Ergebnisse wird hingewiesen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung unserer Arbeiten. Ferner danken wir Frau Ingeborg v. Tippelskirch und Fräulein Annemarie Pagels für ihre Hilfe.

#### Literatur

- Clark, W. M., and M. E. Perkins, 1932: Studies on oxidation-reduction. XVII. Neutral red. J. amer. chem. Soc. 54, 1228.
- Conn, H. J., 1953: Biological stains. 6. Aufl. Geneva, N. Y.
- Danckwortt, P. W., 1949: Lumineszenz-Analyse im filtrierten ultravioletten Licht. 5. Aufl. Leipzig.
- Diannelidis, T., 1951: Zur protoplasmatischen Anatomie des Blattes von *Halophila stipulacea*. Phytol. 3, 29.
- Drawert, H., 1937: Der Einfluß anorganischer Salze auf die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen durch die pflanzliche Zelle. Ber. dtsch. bot. Ges. 55, 380.
- 1948: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Z. Naturforsch. 3 b, 111.
- 1952 a: Die Eigenfluoreszenz der Schuppenblattepidermis von *Allium cepa* L. und ihre Beeinflussung. Z. Bot. 40, 407.
- 1952 b: Der fluoreszenzoptische Nachweis von Chloroplasten in den Schließzellen von *Allium cepa* L. Flora 139, 329.
- 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. 66, 135.
- 1954: Vitalfärbung der Plastiden von *Allium cepa* mit Coelestinblau. Ber. dtsch. bot. Ges. 67, 33.
- 1955 a: Die vitale Fluorochromierung der Sphärosomen (Mikrosomen) mit einem aliphatisch im N substituierten Aminopyren. Naturw. 42, 419.
- 1955 b: Der pH-Wert des Zellsaftes. In W. Ruhland, Handb. d. Pflanzenphysiol. Bd. I. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. In W. Ruhland, Handb. d. Pflanzenphysiol. Bd. II. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- und I. Metzner, 1955: Vitalfluorochromierungen mit Brillantkresylblaupräparaten verschiedener Herkunft. Ber. dtsch. bot. Ges. 68, 385.
- Gutz, H., 1956: Zur Analyse der Granula-Fluorochromierung mit Nilblau in den Hyphen von *Mucor racemosus* Fres. Planta 46, 481.
- Haitinger, M., 1938: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie. Leipzig.
- und L. Linsbauer, 1933: Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie und ihre Anwendung in der Botanik. Beih. bot. Cbl., Abt. A, 50, 432.
- Höfler, K., 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Acridinorange. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 156, 585.
- Kölbels, H., 1948: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. Z. Naturforsch. 3 b, 442.



- Lewis, M. L., 1935: The effect of the vital dye fluorescent x (reduced neutral red, Clark) on living chick embryo cells in tissue cultures. Arch. exper. Zellforsch. 17, 96.
- Rothberger, J., 1898: Differentialdiagnostische Untersuchungen mit gefärbten Nährböden. Zbl. Bakter., I. Abt., 24, 513.
- Schultz, G., 1931: Farbstofftabellen. Bd. I. 7. Aufl. Leipzig.
- Spek, J., 1951: Über das optische Verhalten von Safraninen und Aposafaninen in den verschiedenen Komponenten des Protoplasmas. Protoplasma 40, 239.
- Strugger, S., 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 199.
- 1940: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 34, 601.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Szebelledy, L., und K. Sik, 1938: Über die Fluoreszenz des alizarinsulfosauren Natriums, Azolithmins, der Carminsäure, des Lacmoids, Neutralrots, Phenolrots, der Rosolsäure, des Thymolblaus, Xylenophthaleins. Ber. ung. Ges. 14, 303 (zit. nach Dankwort 1949).
- Toth, A., 1952: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht. Protoplasma 41, 105.
- Weber, F., 1930: Vakuolen-Kontraktion vital gefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma 9, 106.

**Zusammenhänge zwischen reduzierenden Eigenschaften  
und Schutzwirkung von SH-Verbindungen gegen Strahlen**  
(Versuche an Euglobulinlösungen)

Von

**Kurt Erdmann**

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Greifswald

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. März 1956)

In einer vorausgegangenen Arbeit [30] habe ich über eine Reihe von Substanzen berichtet, welche Euglobulin gegen die koagulierenden Wirkungen von ultravioletttem Licht und von Röntgenstrahlen schützen. Dieser Schutz ist je nach Konzentration der Schutzstoffe gegen eine Strahlung von bestimmter Intensität nur für eine bestimmte Zeit möglich. Bestrahlt man Gemische von Euglobulin mit Schutzstoffen lange genug über diese Zeit hinaus, dann kommt es schließlich zu einem Erliegen der schützenden Eigenschaften der fraglichen Substanzen: nunmehr sind die ersten Anzeichen einer Trübung in den so lange gegen die Strahlenwirkungen geschützt gewesenen und infolgedessen klar gebliebenen Euglobulinlösungen zu erkennen.

Einige der in [30] genannten Schutzstoffe, wie Cystein, SH-Glutathion (kurz GSH), Thioglykolsäure bzw. ihr Natriumsalz sowie  $\alpha$ -Monothio-glycerin (kurz  $\alpha$ -MTG), sind Sulfhydrylverbindungen. Die Anwesenheit von SH-Gruppen ist mit der Nitroprussidnatrium-Reaktion (kurz NPN-Reaktion) nachzuweisen. Prüft man Gemische von Euglobulin mit den genannten SH-Verbindungen in den Zusammensetzungen, wie sie in [30] verwandt wurden, während der Bestrahlung mit Hilfe der NPN-Reaktion laufend auf ihren SH-Gehalt, dann zeigt sich, daß unter der Einwirkung der Strahlen die SH-Gruppen der Schutzstoffe allmählich verschwinden. In der Literatur ist in den verschiedensten Zusammenhängen davon berichtet worden, daß SH-Verbindungen durch Strahlen angegriffen und verändert werden. Das geschieht sowohl *in vitro*<sup>1</sup> wie auch *in vivo*<sup>2</sup>. Die

<sup>1</sup> [14, 27, 28, 48, 62, 75, 94, 112].

<sup>2</sup> [41—43, 45, 47, 57, 88, 89, 96, 97, 113].

Ursache dafür ist die Oxydation der SH-Gruppen. Die SH-Gruppen sind entscheidend für die reduzierenden Eigenschaften der Sulfhydrylverbindungen [50]. Mit ihrem Schwinden nehmen dementsprechend auch die reduzierenden Eigenschaften ab.

Ziel der Untersuchungen, über welche in der vorliegenden Arbeit berichtet werden soll, war, zu prüfen: 1. ob die Abnahme der reduzierenden Eigenschaften einiger Strahlenschutzstoffe unter der Einwirkung von ultraviolett Licht und von Röntgenstrahlen sich quantitativ verfolgen läßt und 2. ob sich daraus Zusammenhänge zwischen reduzierenden und gegen Strahlen schützenden Eigenschaften ableiten lassen.

Die Schutzstoffe wurden mit  $n/50$  wässriger Jodlösung titriert (Gehalt an KI = 0,4%). Diese Titration beruht auf den oxydierenden Eigenschaften des Jods. Mit der Jodtitration wird die Menge der in den zu untersuchenden Lösungen vorhandenen reduzierenden Substanzen erfaßt. Erfahren diese unter den Einwirkungen von Licht oder Strahlen oxydative Veränderungen, dann geben jodometrische Bestimmungen Auskunft darüber, wieviel reduzierende Substanz nach verschiedenen Bestrahlungszeiten noch vorhanden ist. Wie die Literatur ausweist, kann man mittels Jodtitration bestimmen: sowohl SH-Gruppen allgemein [1, 3–5, 13, 17, 22, 24, 29, 44, 51–54, 70, 71, 77, 82, 85, 87] als auch insbesondere SH-Glutathion [17, 21–23, 44, 60, 62, 65, 74, 77, 79, 81, 82, 87 a, 91, 92, 95, 99, 105, 108], ferner Cystein [12, 17, 54, 73, 77, 86, 98, 107] und Thioglykolsäure [17, 19, 40, 59, 63, 77, 80, 93].

### Methodik

Die Verfahren zur Herstellung von Euglobulin aus Rinderserum und der Ausgangslösungen der Schutzstoffe sind in der vorhergehenden Arbeit ([50] auf S. 294–295) beschrieben worden. Zu Beginn jedes Versuches wurden drei Lösungen wie folgt angesetzt:

**Lösung I:** 2 Teile Euglobulin (z. B. 120 cm<sup>3</sup>) wurden mit 1 Teil Ausgangslösung des zu untersuchenden Schutzstoffes (z. B. 60 cm<sup>3</sup>) zusammengegeben<sup>3</sup>. Die Lösung I enthielt also Euglobulin und Schutzstoff nebeneinander, und zwar in demselben Verhältnis wie die in der vorhergehenden Arbeit verwendeten Lösungen (s. [50], S. 295).

**Lösung II:** 2 Teile destillierten Wassers + 1 Teil Ausgangslösung des jeweiligen Schutzstoffes. Lösung II enthielt also nur den Schutzstoff in der gleichen Konzentration wie Lösung I, in ihr konnte das Verhalten des Schutzstoffes in reiner Lösung beurteilt werden.

**Lösung III:** 2 Teile Euglobulinlösung + 1 Teil  $m/32$  NaCl. Lösung III enthielt also nur Euglobulin in der gleichen Konzentration wie Lösung I. In Vergleich von Lösung III mit den Lösungen I und II konnte die Frage entschieden werden, ob die Gegenwart von Euglobulin die Reaktion der

<sup>3</sup> Alle zu untersuchenden Substanzen, außer Cystein-Hydrochlorid, wurden in  $m/32$  NaCl gelöst, damit die Ergebnisse mit den für den bekanntesten Schutzstoff, das Cystein, erhaltenen vergleichbar blieben. Ausführliche Begründung s. [50], S. 296.

Schutzstoffe mit Jod beeinflusste oder nicht, insbesondere inwieweit das Euglobulin ebenfalls Jod band.

Das pH dieser drei Lösungen wurde auf den Wert 6 eingestellt, die Gründe dafür s. [30], S. 295. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde jede der drei Lösungen geteilt in die zu bestrahlende Portion und die nicht zu bestrahlende Kontrollportion.

Die Bestrahlungen mit ultravioletttem Licht erfolgten wie in [30] auf S. 295 geschildert.

Die Röntgenbestrahlungen wurden mit dem VEM-Grobstruktur-Untersuchungsgerät des VEB Transformatoren- und Röntgenwerk Dresden durchgeführt. Die drei zu bestrahlenden Lösungen standen in Schichten von 22 mm Höhe in Schälchen von 55 mm lichtigem Durchmesser, bedeckt mit Cellophan auf einem langsam rotierenden Tischchen, dessen Oberfläche 17 cm vom Fokus der Röhre entfernt war; die mittleren Schichten der zu bestrahlenden Lösungen waren also 16 cm vom Fokus entfernt. Die Röhre war eine Phönix-Therapie-Röhre vom Typ EWG 200/20ö (und zwar Nr. 776126). Bestrahlt wurde nur mit der Eigenfilterung der Röhre (= 1-mm-Al-Filter) bei 20 mA Stromstärke und 200 V Primärspannung = 160 kVs (= „Scheitelwert“). Nach Eichung mit dem „Ionogom“ der Physikalisch-Technischen Werkstätten Freiberg (Baden) lieferte die Röhre bei diesen Bedingungen in 16 cm Abstand vom Fokus pro Min. 790 r; die Messungen wurden in Luft durchgeführt<sup>4</sup>.

Das Tischchen, welches die Schälchen trug, war mit einer 6 mm dicken Schicht von Paraffin belegt, weil zusätzlich zu der direkten Strahlung auch die Streustrahlung ausgenutzt werden sollte (diese kann mit etwa 5% der direkten Strahlung veranschlagt werden).

Sowohl während der UV-Bestrahlungen wie auch während der Röntgenbestrahlungen wurden die nicht zu bestrahlenden Kontrollen bei sonst gleichen Bedingungen gehalten wie die zu bestrahlenden Lösungen.

Für die Titration wurden während der UV-Bestrahlungen aus den drei unter Strahleneinfluß stehenden Lösungen sowie aus den drei nicht bestrahlten Kontrolllösungen in bestimmten Abständen je 3 cm<sup>3</sup> entnommen. In den Versuchen mit Röntgenbestrahlung wurden alle 30 Minuten je 2 cm<sup>3</sup> entnommen, da aus technischen Gründen nicht so große Mengen der drei Lösungen zur Bestrahlung gebracht werden konnten wie in den UV-Versuchen. Zu jeder dieser sechs Proben wurden drei Tropfen Stärkelösung zugefügt [60], danach wurde aus einer Mikrobürette mit n/50 Jodlösung bis zum Umschlag nach Blau titriert.

Die Titration wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Theoretisch ist für 3 cm<sup>3</sup> von m/100 Lösungen der untersuchten reduzierenden Stoffe mit einem Verbrauch von 1,5 cm<sup>3</sup> n/50 Jodlösung zu rechnen. Die gemessenen Werte stimmten mit den theoretischen überein für GSH, für Thioglykolsäure und für  $\alpha$ -MTG. Bei m/100 Cystein waren die gemessenen Werte et-

<sup>4</sup> Der Hautklinik der Universität Greifswald danke ich für leihweise Überlassung des Gerätes.

was höher als die theoretischen, demzufolge waren Korrekturen erforderlich (vgl. [20, 65]).

In Vorversuchen hatte ich mich für jeden der untersuchten Schutzstoffe davon überzeugt, daß bei den verwendeten Konzentrationen der Jodverbrauch der gleiche ist, wenn man die Jodtitrationen bei pH 1,5 oder bei pH 6 durchführt (vgl. dazu auch [61]). Es wurden auch Versuche angestellt, in welchen einerseits ein zugefügter Überschuß von Jod mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  zurücktitriert wurde und andererseits mit Jod direkt titriert wurde. Diese Versuche ergaben Übereinstimmung der mit beiden Verfahren erhaltenen Werte. Nach [2, 65] zeichnet sich die jodometrische Bestimmungsweise durch ihre von keiner anderen Methode erreichte Einfachheit und Genauigkeit aus. Nach Orientierung in der Literatur und nach den Ergebnissen der Vorversuche wurden die Bestimmungen in der Weise durchgeführt, daß bei Zimmertemperatur und pH 6 direkt mit  $n/50$  Jodlösung und Stärke als Indikator titriert wurde.

Die aus den Titrationen erhaltenen Werte wurden zu Kurven zusammengestellt. Für die Abbildungen, welche der vorliegenden Arbeit beigegeben sind, ist aus den Versuchsreihen, welche mit den einzelnen Schutzstoffen angestellt worden sind, jeweils nur ein besonders charakteristischer Versuch ausgewählt worden.

### Ergebnisse bei Bestrahlungen mit ultravioletem Licht

Die Abb. 1 ist ein Beispiel für eine Serie von Versuchen mit  $m/100$  SH-Glutathion<sup>5</sup>. Sie zeigt folgendes:

a) Reine nicht bestrahlte Euglobulinlösungen enthielten nur sehr geringe Mengen von reduzierenden Substanzen und verbrauchten deshalb nur wenig Jod (praktisch gleich Null, s. Kurve III u). In den ersten 20–30 Minuten der UV-Bestrahlungen stieg der Gehalt reiner Euglobulinlösungen an reduzierenden Stoffen ein wenig an, er blieb dann auf dem nach etwa 30 Minuten erreichten Wert (s. Kurve III b). Diese geringfügige Erhöhung wurde in allen Versuchen regelmäßig beobachtet. Sie ist vielleicht zurückzuführen auf die seit langem bekannte Tatsache, daß zu Beginn der Denaturierung von Eiweiß (auch seiner Denaturierung durch UV-Licht) sogenannte „maske“ SH-Gruppen reaktionsfähig werden, welche bis dahin in intramolekularen Bindungen beansprucht waren<sup>6</sup>. Für die Reaktion der Schutzstoffe mit Jod in den Gemischen I b erscheint die genannte schwache Vermehrung der reduzierenden Stoffe im bestrahlten Euglobulin belanglos.

<sup>5</sup> Entsprechende Abbildungen aus den Versuchsserien mit den anderen Schutzstoffen publiziere ich aus Gründen der Raumersparnis nicht. Sie zeigen bezüglich der Verhältnisse der sechs Kurven zueinander im Prinzip Ähnliches wie Abb. 1. Für den Vergleich der verschiedenen Schutzstoffe untereinander sind aus ähnlichen Kurvenscharen, wie sie die Abb. 1 für GSH darstellt, in Abb. 2 diejenigen Kurven zusammengestellt, welche für diesen Vergleich die wichtigsten sind, nämlich die Kurven I b.

<sup>6</sup> [50, 7, 49, 106, 55, 56, 109, 110, 66, 25, 26, 111, 83, 100–104, 38, 84, 6, 39, 16, 46, 15, 72, 76, 78, 90].

b) In reinen Lösungen der Schutzstoffe nahm unter der Einwirkung ultravioletten Lichtes der Jodverbrauch laufend ab; nach genügend langer Dauer der Bestrahlung erreichte er einen Endwert; auf diesem verblieb er bei Fortdauer der Bestrahlung (s. Kurve II b). Auch in den unbestrahlten Kontrollösungen der Schutzstoffe sank infolge Autoxydation der Jodverbrauch allmählich ab (s. Kurve II u), dieser Abfall war jedoch wesentlich geringer als unter Einwirkung der Strahlen (vgl. II b).

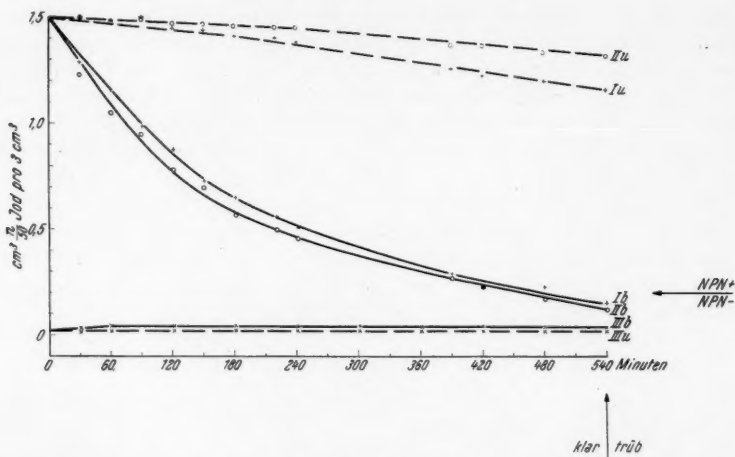


Abb. 1. Veränderungen der reduzierenden Eigenschaften (bestimmt durch Titration mit  $n/50$  Jod in wässriger Lösung) in einem Gemisch von Euglobulin mit  $m/100$  SH-Glutathion (= I), in reinem  $m/100$  GSH (= II) und in reinem Euglobulin (= III) bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (= b) und ohne Bestrahlung (= u).

Auf der Horizontalen die Zeit in Minuten. Die Vertikale gibt an, wieviel Kubikzentimeter  $n/50$  Jod für  $3 \text{ cm}^3$  Lösung verbraucht wurden.

Der von rechts hereinweisende Pfeil bezeichnet das Niveau des Jodverbrauches, oberhalb dessen die NPN-Reaktion positiv ausfällt, unterhalb dieses Niveaus sind keine SH-Gruppen mehr nachzuweisen. Der von unten hereinweisende Pfeil zeigt auf den Zeitpunkt, in welchem die so lange klare Mischung von Euglobulin mit GSH opaleszent wurde. Weiteres ist aus dem Text ersichtlich (S. 387—388).

c) Blieben die Gemische von Euglobulin mit den Schutzstoffen (Kurven I) unbestrahlt, dann verloren sie nur langsam von ihren reduzierenden Eigenschaften (s. I u). Wurden die Gemische dagegen mit ultraviolettem Licht bestrahlt, dann nahm ihr Jodverbrauch während der ersten Stunden erheblich ab (s. I b). Bei Fortdauer der Bestrahlung wurde die Abnahme pro Zeiteinheit geringer, und schließlich erreichte der Gehalt an noch vorhandener reduzierender Substanz einen Endwert (s. Abb. 2).

Kurze Zeit bevor dieser Endwert erreicht wurde, konnten in den Gemischen von Euglobulin mit GSH, mit Cystein und mit Thioglykolsäure mit Hilfe der NPN-Reaktion keine SH-Gruppen mehr nachgewiesen werden.

Die von rechts in die Abbildungen hineinweisenden Pfeile zeigen dasjenige Niveau an, unterhalb dessen die NPN-Reaktion negativ ausfiel. Bald nachdem keine SH-Gruppen mehr nachgewiesen werden konnten, wurden in den bestrahlten Gemischen die ersten Trübungen des Euglobulins sichtbar. Die Zeit, bis zu welcher in den Lösungen I b das Euglobulin unter der Wirkung der Schutzstoffe klar blieb, ist in den Abbildungen durch von unten in die Zeichnungen hineinweisende Pfeile markiert. Nach Überschreiten die-

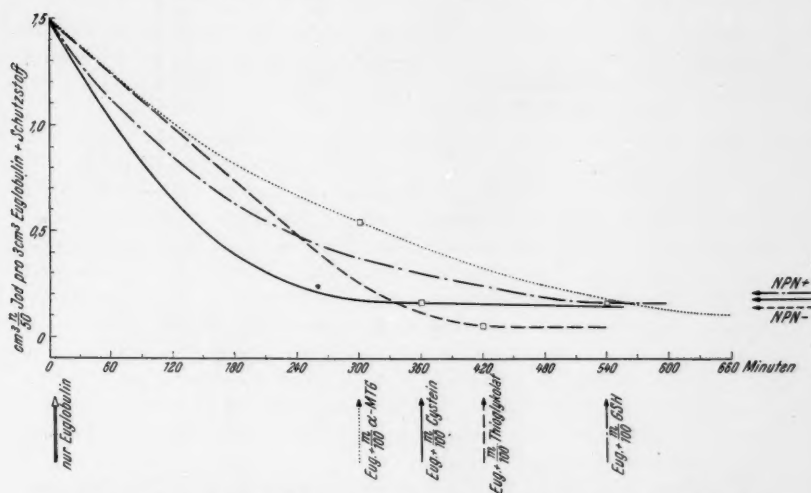


Abb. 2. Vergleich des Verhaltens der reduzierenden Eigenschaften bei UV-Bestrahlung in Gemischen von Euglobulin mit Anfangskonzentrationen von

m/100 Cystein —————  
 m/100 α-Mono-Thioglycerin .....  
 m/100 Thioglykolsäure - - - - -  
 m/100 SH-Glutathion — · —

Vertikale = Jodverbrauch für 3 cm<sup>3</sup> Gemisch.

Die Pfeile unter der Horizontalen bezeichnen die Zeitpunkte, ab welchen die verschiedenen Substanzen keinen Schutz mehr geben; der doppelt konturierte Pfeil weist auf den Zeitpunkt, ab welchem das Euglobulin ohne Schutzstoff beginnt, trüb zu werden.

Die Pfeile rechts bezeichnen das Niveau, unterhalb dessen mit der NPN-Reaktion kein SH mehr nachgewiesen werden kann. Weitere Einzelheiten im Text (S. 388—390).

ser Zeit (in den Abbildungen also rechts von den Pfeilen) wurde das Euglobulin unter Einwirkung der Strahlen zunächst opaleszent und dann zunehmend trübe.

Die für Cystein, SH-Glutathion und Thioglykolsäure erhobenen Befunde stimmen weitgehend überein: Nach Schwinden der SH-Gruppen und Absinken der reduzierenden Eigenschaften auf den Endwert erlahmte die gegen UV schützende Kraft dieser drei SH-Verbindungen.



Versuche, über welche hier nicht ausführlich berichtet werden soll, haben ergeben, daß es bei Verwendung von GSH oder von Cystein als Schutzstoff gleichgültig war, ob die beiden Substanzen bei Beginn der Versuche in höheren oder in geringeren Konzentrationen, also mit entsprechend verschiedenen Quantitäten an reduzierender Substanz vorgelegen hatten: In allen Versuchen war zu der Zeit, in welcher GSH und Cystein ihre Schutzstoffeigenschaften verloren, der Gehalt an reduzierender Substanz immer auf praktisch gleiches Niveau abgesunken.

Ähnlich wie GSH und Cystein verhielt sich auch Thioglykolsäure. Daraus ergibt sich für diese drei SH-Verbindungen der Schluß, daß ihre Fähigkeiten, als Strahlenschutzstoffe wirken zu können, weitgehend mit ihren reduzierenden Eigenschaften zusammenhängen.

Andere Verhältnisse fanden sich für  $\alpha$ -Mono-Thioglycerin: Diese SH-Verbindung schützte bereits bei noch relativ hohem Jodverbrauch nicht mehr, obwohl die NPN-Reaktion noch deutlich positiv ausfiel. Die NPN-Reaktion war zu dieser Zeit in den bestrahlten Portionen zwar schon wesentlich schwächer als in den unbestrahlten Portionen, sie zeigte jedoch noch deutlich, daß zu der Zeit, in welcher das  $\alpha$ -MTG nicht mehr schützte, noch reichlich SH-Gruppen vorhanden waren. Die diesbezüglichen Versuche erstreckten sich mit längeren Unterbrechungen über einen Zeitraum von 3 Jahren, die Resultate waren immer gut reproduzierbar, es kann also kein Zweifel darüber bestehen, daß das  $\alpha$ -MTG sich von den anderen drei SH-Körpern deutlich unterschied, und zwar dadurch, daß seine Schutzkraft gegen UV bereits versagte, lange bevor es seine SH-Gruppen und seine reduzierenden Eigenschaften vollständig verlor.

Für dieses Abweichen des  $\alpha$ -MTG von den anderen drei SH-Verbindungen kann ich keine Erklärung geben. In den später zu besprechenden Versuchen mit Röntgenbestrahlung (s. S. 392) stimmte  $\alpha$ -MTG in seinem Verhalten mit den anderen SH-Verbindungen überein (vgl. Abb. 3).

Eine vergleichende Übersicht über das bisher Mitgeteilte gibt die Abb. 2. In sie sind aus besonders charakteristischen Versuchen mit den verschiedenen Schutzstoffen jeweils nur die Kurven 1b aufgenommen worden, also diejenigen Kurven, welche Auskunft geben über die Veränderungen der reduzierenden Eigenschaften in den Gemischen von Euglobulin mit den einzelnen Schutzstoffen. Die Kurven der verschiedenen Schutzstoffe sind in verschiedener Manier gezeichnet, und die Zeiten, in welchen die Substanzen aufhören, als Schutzstoffe zu wirken, sind durch Pfeile in der entsprechenden Signatur bezeichnet; diese Pfeile weisen von unten in die Abbildung hinein. Die Jodwerte, bei welchen die schützenden Kräfte der Schutzstoffe erliegen, sind durch kleine Quadrate im Verlauf der Kurven hervorgehoben.

### Ergebnisse bei Bestrahlungen mit Röntgenstrahlen

Das nicht geschützte Euglobulin zeigte in den Versuchen mit UV-Bestrahlung, über welche im vorhergehenden Abschnitt berichtet worden ist, bereits nach UV-Einwirkungen von durchschnittlich 5 Minuten Dauer die ersten sichtbaren Strahlenwirkungen, indem es im Vergleich zu den nicht bestrahl-

ten Kontrollen zunächst opaleszierte und sich anschließend trübte. Dieser Effekt war ohne besondere Behandlung sichtbar. Nach Röntgenbestrahlungen wurde der zunächst nicht sichtbare Strahleneffekt auf das Euglobulin nach dem in [30], S. 308—309 beschriebenen Verfahren durch einstündiges Erwärmen auf 56°C „entwickelt“<sup>7</sup>. In ungeschütztem Euglobulin der üblichen Konzentration waren nach solcher Nachbehandlung im Durchschnitt der Versuche nach Röntgenbestrahlungen von 100 Minuten Dauer die ersten Strahlenwirkungen in Gestalt von Opaleszenz und nachfolgender Trübung zu erkennen.

Während der Röntgenbestrahlungen in regelmäßigen Zeitintervallen durchgeführte Jodtitrationen ergaben folgendes Resultat: Cystein, SH-

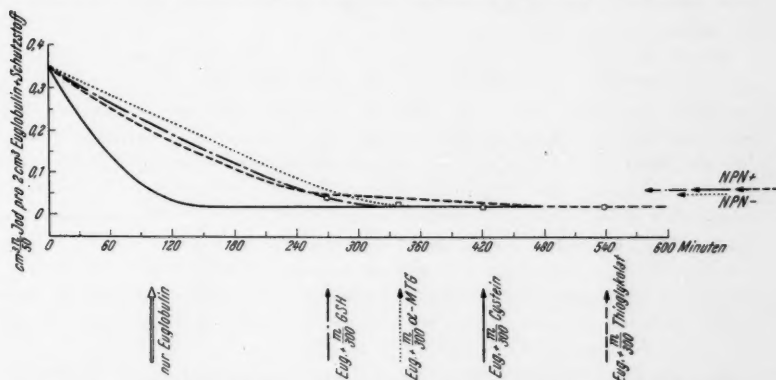


Abb. 3. Vergleich des Verhaltens der reduzierenden Eigenschaften bei Röntgenbestrahlung in Gemischen von Euglobulin mit m/300 GSH, m/300  $\alpha$ -MTG, m/300 Cystein, m/300 Thioglykolsäure.

Vertikale = Jodverbrauch für 2 cm<sup>3</sup> Gemisch. Sonst Zeichenerklärung und Einzelheiten wie zu Abb. 2.

Glutathion, Thioglykolsäure und  $\alpha$ -Monothioglycerin in reinen Lösungen und in Gemischen mit Euglobulin verloren unter der Einwirkung von Röntgenstrahlen ihre Fähigkeit, mit Jod zu reagieren. Die vier SH-Verbindungen büßten zugleich damit auch ihre mit der NPN-Reaktion nachweisbaren SH-Gruppen und ihre Fähigkeit, das Euglobulin gegen Röntgenstrahlen zu schützen, ein.

Ich verzichte auf die bildliche Darstellung von einzelnen besonders charakteristischen Röntgenversuchen und begnüge mich damit, in Abb. 3 eine ähnliche Zusammenstellung aus den Röntgenversuchen zu geben wie in Abb. 2 für die UV-Versuche. Die stets in gleicher Weise applizierte Röntgenstrahlung wirkte langsamer auf das Euglobulin als die UV-Strahlung in der anderen Versuchsserie. Das ist wohl der Grund dafür, daß alle

<sup>7</sup> Zur Begründung dieser Methode s. außer den Darlegungen in [30] auch die Arbeiten von A. Fernau [31—37].

untersuchten Schutzstoffe in m/100 Konzentrationen selbst unter 9- bis 10stündigem Einwirken der Röntgenstrahlen ihr Reaktionsvermögen mit Jod nicht so vollständig verloren, wie das in den UV-Versuchen der Fall war. Damit war eine Beurteilung eventueller Zusammenhänge zwischen reduzierenden und schützenden Eigenschaften aus Versuchen mit m/100 Schutzstoffen schlecht möglich. Um sicher urteilen zu können, wurde eine zweite Versuchsserie mit Röntgenbestrahlungen von m/300 Schutzstoffen durchgeführt. Die wesentlichen Befunde dieser Reihe von Versuchen sind in Abb. 3 zusammengestellt. Auch in die Abb. 3 sind nur die Kurven I b aus besonders charakteristischen Versuchen aufgenommen worden. Die Kurven der verschiedenen Schutzstoffe lagen so dicht beieinander, daß aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abb. 3 die Vertikale in doppeltem Maßstab gezeichnet worden ist wie in Abb. 2.

Bei der bekannten Verschiedenheit der physikalischen Primärwirkungen von UV und Röntgenstrahlen war völlige Gleichheit der Resultate nicht zu erwarten. Vergleicht man Abb. 3 mit Abb. 2, dann muß man feststellen, daß bei geringfügigen Abweichungen (so besonders in der Reihenfolge, in welcher die schützenden Kräfte der Substanzen erlahmen, s. die Pfeile unter den Horizontalen) die Ähnlichkeiten in beiden Abbildungen recht weit gehen: Als Beispiele seien hervorgehoben, daß die Kurven der Jodwerte von Cystein in beiden Abbildungen am schnellsten abfallen und in relativ scharfen Bögen in die Endwerte ausschwingen, während GSH, Thioglykolsäure und  $\alpha$ -Monothioglycerin ihr Jodbindungsvermögen langsamer verlieren, wodurch die entsprechenden Kurven in sanfteren Bögen in die Endwerte ausschwingen. Im Hinblick auf das Wesentliche finden sich also in beiden Abbildungen mehr Ähnlichkeiten als Verschiedenheiten.

### Auswertung der Versuchsergebnisse

In [30] ist auf S. 297—298 über Versuche berichtet worden, in welchen Cystein, Serin und Alanin bezüglich ihres Einflusses auf UV-Bestrahlung von Euglobulin verglichen wurden. Diese Versuche haben gezeigt, daß die SH-Gruppe im Molekül des Cysteins wesentlich, wenn nicht gar entscheidend ist für sein Funktionieren als Schutzstoff gegen UV: Unter gleichen Bedingungen konnte nur Cystein das Euglobulin gegen UV-Bestrahlungen schützen, Serin und Alanin dagegen nicht.

In einer anderen Reihe von bisher nicht veröffentlichten Versuchen wurden  $\alpha$ -Monothioglycerin und Glycerin hinsichtlich ihrer Schutzmöglichkeiten verglichen, mit dem Ergebnis, daß Glycerin dem Euglobulin überhaupt keinen Schutz gegen UV-Bestrahlung bieten konnte (nicht einmal eine geringfügige Verzögerung der UV-Wirkung war im Vergleich zu den zusatzfreien Kontrollen festzustellen). Das  $\alpha$ -MTG dagegen schützte. Beide Stoffe unterscheiden sich nur dadurch, daß das Monothioglycerin in  $\alpha$ -Stellung eine SH-Gruppe an Stelle der OH-Gruppe trägt. Demnach genügt also offenbar die Anwesenheit dieser SH-Gruppe, um das  $\alpha$ -MTG zu einem Schutzstoff werden zu lassen, und das  $\alpha$ -MTG schützt das in den vorliegenden Versuchen verwendete Euglobulin, auch ohne im Besitz einer  $\text{NH}_2$ -Gruppe zu

sein. Das gleichzeitige Nebeneinander von SH-Gruppe und  $\text{NH}_2$ -Gruppe, das B a c q und Mitarbeiter [8—11] sowie L a n g e n d o r f f und Mitarbeiter [64, 67] nach ihren Versuchen an Kleinsäugern als wesentlich für das Zustandekommen der Schutzwirkung des Cysteins und seiner Verwandten ansahen, ist also für die Erzielung eines Schutzeffektes auf Euglobulin gegen UV nicht notwendig. Unsere Befunde, daß Thioglykolsäure Euglobulin gegen UV und Röntgenstrahlen schützt, zeigen ebenfalls, daß es nicht erforderlich ist, daß zur SH-Gruppe noch eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe hinzukommen muß, um einer SH-Verbindung Schutzstoffeigenschaften zu verleihen. Diese Feststellung kann natürlich nur für unser Objekt, das Euglobulin, gemacht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen wahrscheinlich, daß die Schutzstoffeigenschaften des Cysteins von seinem Reduktionsvermögen abhängen, welches seinerseits durch den Besitz der SH-Gruppe bedingt ist. Bei den Bestrahlungen mit UV oder mit Röntgenstrahlen liegen die oxydativen Wirkungen beider Strahlenarten im Widerstreit mit den reduzierenden Eigenschaften des Cysteins. Unter der Einwirkung der Strahlen schwinden SH-Gruppen und reduzierende Eigenschaften, und nach deren Verschwinden kann das Bestrahlungsprodukt nicht mehr gegen Strahlenwirkungen schützen.

Bei der Verwandtschaft von Cystein und SH-Glutathion war kaum zu erwarten, daß GSH sich grundsätzlich anders verhalten würde als Cystein, und die Versuche, welche der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen, haben diese Erwartung bestätigt. Thioglykolsäure zeigte ähnliche Verhältnisse wie Cystein und GSH. Die Fähigkeiten dieser drei SH-Verbindungen, Euglobulin gegen UV und Röntgenstrahlen zu schützen, hängen wohl weitgehend von ihren reduzierenden Eigenschaften ab. Man darf aber wohl nicht nach den an Cystein, GSH und Thioglykolat erhobenen Befunden ähnliche Zusammenhänge bei allen SH-Körpern für wahrscheinlich halten. Vor solcher Verallgemeinerung warnen die Ergebnisse aus den Versuchen mit UV-Bestrahlung von  $\alpha$ -Monothioglycerin. Daß für die Schutzkraft des  $\alpha$ -MTG wiederum die SH-Gruppe wesentlich ist, haben die bereits erwähnten Versuche gezeigt, in welchen  $\alpha$ -MTG und einfaches Glycerin verglichen wurden und in welchen das Glycerin nicht schützte, während das  $\alpha$ -MTG schützte. Die Schutzkraft des  $\alpha$ -MTG hängt aber nicht in demselben Grade von seinen reduzierenden Eigenschaften ab wie bei GSH, Cystein und Thioglykolsäure, denn diese drei SH-Verbindungen hören erst auf zu schützen, nachdem die SH-Gruppen und die Fähigkeit, Jod zu reduzieren, durch die Strahlen bis zur Grenze des Möglichen verändert sind, das  $\alpha$ -MTG dagegen verliert seine gegen UV schützende Kraft bereits lange vor dem völligen Verlust seiner SH-Gruppe und seiner reduzierenden Eigenschaften. In Versuchen mit Röntgenbestrahlungen hat sich das  $\alpha$ -MTG ganz ähnlich verhalten wie die anderen drei SH-Verbindungen, es verlor nämlich wie diese seine Schutzkraft erst, nachdem es seine SH-Gruppe und sein Reduktionsvermögen für Jod eingebüßt hatte (s. Abb. 3).

Ähnliche Versuche wie diejenigen, über welche in der vorliegenden

Arbeit berichtet worden ist, habe ich auch mit Ascorbinsäure, Natriumsulfit ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), Thioharnstoff und Allylthioharnstoff angestellt. Mit drei weiteren Substanzen, von welchen ich in [30] berichtet habe, daß sie Euglobulin gegen Strahlen schützen (nämlich  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{NaN}_3$  und Rutin), waren entsprechende Versuche nicht möglich, weil sie durch Titration mit Jod nicht bestimmt werden konnten. Man kann, wie die Literatur ausweist, Ascorbinsäure,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  und die beiden Thioharnstoffe in reinen Lösungen mit Jod titrieren. Bestrahlungen mit UV und mit Röntgenstrahlen ergaben für Zusammenhänge zwischen Jodbindungsvermögen und Schutzvermögen andere Verhältnisse als in den Versuchen mit den vier SH-Verbindungen. Ich bin nicht Chemiker, sondern Zoologe und möchte mich mit der Feststellung dieser Tatsachen begnügen, ohne zu ihren chemischen Ursachen Stellung zu nehmen.

### Zusammenfassung

Der Abbau der reduzierenden Eigenschaften der Strahlenschutzstoffe Cystein, SH-Glutathion, Thioglykolat und  $\alpha$ -Monothioglycerin in reinen Lösungen und in Gemischen mit Euglobulin unter dem Einwirken von ultravioletem Licht und von Röntgenstrahlen wird mittels direkter Jodtitrationen (Stärke als Indikator) bis zum Erliegen der Schutzstoffeigenschaften und darüber hinaus verfolgt.

Die Ergebnisse der Versuche mit Cystein, SH-Glutathion und Thioglykolat machen es wahrscheinlich, daß bei diesen drei Verbindungen ein ursächlicher Zusammenhang zwischen reduzierenden Eigenschaften und Schutzstoffeigenschaften besteht.

Den Herren Prof. Dr. P. Wels, Dr. F. Markwardt, Dipl.-Chem. H. Dalibor und Apotheker H. D. Schlabitx vom Pharmakologischen Institut sowie Herrn Doz. Dr. G. Henseke vom Institut für Organische Chemie der Universität Greifswald danke ich für fördernde Diskussionen. Fräulein Gerda Rahmel danke ich für technische Assistenz.

### Literatur

- [1] Aldridge, W. N., 1948: *Biochem. J.* 42, 52—58, s. S. 55.
- [2] Ammon, R., W. Dirscherl, 1948: *Fermente, Hormone, Vitamine*. 2. Aufl. G. Thieme, Leipzig.
- [3] Anson, M. L., 1940: *J. gen. Physiol. (Am.)* 23, 321—331.
- [4] — 1941: *J. gen. Physiol. (Am.)* 24, 399—421.
- [5] — W. M. Stanley, 1941: *J. gen. Physiol. (Am.)* 24, 679—690.
- [6] — 1945: *Advances in Protein Chemistry* 2, 361—386.
- [7] Arnold, V., 1911: *Z. physiol. Chem.* 70, 300—309 und 314—325.
- [8] Baeg, Z. M., A. Herve, J. Lecomte, P. Fischer, J. Blavier, G. Dechamps, H. LeBihan, P. Rayet, 1951: *Arch. intern. Physiol.* 59, 442—447.
- [9] — — 1952: *Bull. Acad. Méd. Belg.* 17, 15—58.
- [10] — — 1954: *Strahlenther.* 95, 215—237.
- [11] — P. Alexander, 1955: *Butterworths Sci. Publ. Lond.* 308.

- [12] Baernstein, H. D., 1930: J. biol. Chem. (Am.) 89, 125—131.
- [13] — 1936: J. biol. Chem. (Am.) 115, 25—32 und 33—36.
- [14] Barron, E. S. G., Veronica Flood, 1949: J. gen. Physiol. (Am.) 33, 229—241.
- [15] — 1951: Advances in Enzymology 11, 201—266.
- [16] Basu, S., S. P. Nandi, 1951: Enzymologia (Den Haag) 14, 397—401; zit. n. Ber. ges. Physiol. 149, 252, 1952.
- [17] Bauer, K. H., H. Moll, 1954: Die organische Analyse. Leipzig.
- [18] Belicer, V. A., A. S. Cyperovic, 1952: Dokl. Akad. Nauk SSSR 83, 257—259; zit. n.: Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 95, 454, 1952.
- [19] Benk, E., 1949: Seifen, Öle, Fette, Wachse 75, 143—144; zit. n.: Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 94, 385, 1952.
- [20] Bierich, R., K. Kalle, 1928: Z. physiol. Chem. 175, 115—134.
- [21] Blanchetière, A., L. Binet, 1926: C. r. Soc. Biol. 94, 494—496 und 1227—1229.
- [22] — — 1926: C. r. Soc. Biol. 95, 558—559 und 621—622.
- [23] — L. Mélon, 1927: C. r. Soc. Biol. 97, 242—244.
- [24] Block, R. J., D. Bolling, 1951: The Amino Acid Composition of Proteins and Foods. Springfield, Illinois.
- [25] Brdička, R., 1956: Collection of Czechoslovak. Chem. Communications (Prag) 8, 366—376.
- [26] — 1937: Bull. int. Acad. Tchèque Sci. 38, 17—22.
- [27] Dale, W. M., 1951: J. Chim. Phys. Physic. Chim. Biol. 48, 245—248.
- [28] — J. V. Davies, 1951: Biochem. J. 48, 129—132.
- [29] Engelhard, H., und K. R. Eikenberg, 1955: Z. Naturforsch. 10 b, 622—631.
- [30] Erdmann K., 1955: Protoplasma 45, 293—314.
- [31] Fernau, A., W. Pauli, 1915: Biochem. Z. 70, 426—441.
- [32] — — 1917: Kolloid-Z. 20, 20—33.
- [33] — — 1922: Kolloid-Z. 30, 6—15.
- [34] — 1923: Strahlenther. 15, 532—536.
- [35] — 1926: Biochem. Z. 167, 380—383.
- [36] — 1927: Biochem. Z. 189, 172—174.
- [37] — M. Spiegel-Adolf, 1927: Klin. Wschr. 6, 1798—1800.
- [38] Fiala, S., 1943: Naturw. 31, 370.
- [39] — 1948: Biochem. Z. 318, 67—73.
- [40] Fischer, E. K., 1930: J. biol. Chem. (Am.) 89, 753—763.
- [41] Flesch, P., S. Rothman, 1948: Science 108, 505—506.
- [42] Frederic, J., 1948: C. r. Soc. Biol. 142, 850—853.
- [43] — 1949: Arch. Biol. (Fr.) 60, 79—101.
- [44] Glick, D., 1954: Methods of Biochemical Analysis. New York, Interscience Publishers.
- [45] Goldwater, K. B., 1929/30: Proc. Soc. exper. biol. a. Med. (Am.) 27, 1031—1033.
- [46] Groves, M. L., N. J. Hipp, T. L. McMeekin, 1951: J. amer. chem. Soc. 73, 2790—2793.
- [47] Hammett, F. S., M. Green, E. Davenport, 1932: Protoplasma 15, 415—421.
- [48] — 1932: Protoplasma 15, 422—426.
- [49] Harris, L. J., 1923: Proc. roy. Soc. Lond. B. 94, 426—441.
- [50] Heffter, A., 1908: Med.-naturw. Arch. 1, 81—103.



- [51] Hellerman, L., M. E. Perkins, W. M. Clark, 1933: *Proc. nat. Acad. Sci.* 19, 855—860.
- [52] — — 1934: *J. biol. Chem. (Am.)* 107, 241—255.
- [53] Herriott, R. M., 1947: *Advances in Protein Chemistry* 3, 169—225, speziell S. 177—178.
- [54] Hess, W. C., M. X. Sullivan, 1945: *J. biol. Chem. (Am.)* 151, 635—642, speziell S. 639.
- [55] Hopkins, F. G., 1925: *Biochem. J. (Brit.)* 19, 787—819.
- [56] — 1930: *Nature* 126, 328—330 und 383—384.
- [57] Hueper, W. C., A. Allen, M. Russell, G. Woodward, M. Platt, 1933: *Amer. J. Canc.* 17, 74—105.
- [58] Jühling, L., C. Tropp, E. Wöhlisch, 1939: *Z. physiol. Chem.* 262, 210—224.
- [59] Kharasch, M. S., R. R. Legault, A. B. Wilder, R. W. Gerard, 1936: *J. biol. Chem. (Am.)* 113, 537—555 und 557—569.
- [60] King, E. L. Baumgartner, I. H. Page, 1930: *Biochem. Z.* 217, 589—594.
- [61] King, E. J., C. C. Lucas, 1931: *Biochem. Z.* 235, 66—69.
- [62] Kinsey, V. E., 1935: *J. biol. Chem. (Am.)* 110, 551—558.
- [63] Klason, P., und T. Carlson, 1906: *Ber. dtsh. chem. Ges.* 39, 738—742.
- [64] Koch, R., 1935: *Arzneimittelforsch.* 5, 271—275.
- [65] Kühnau, J., 1931: *Biochem. Z.* 230, 353—372.
- [66] Lampert, U., P. Wels, 1934: *Arch. exper. Path. (D.)* 175, 554—557.
- [67] Langendorff, H., R. Koch, U. Hagen, 1934: *Strahlenther.* 95, 238—250.
- [68] — — — 1934: *Arch. internat. Pharmacodynam.* 100, 1—16.
- [69] — 1935: *Arzneimittelforsch.* 5, 265—271.
- [70] Larson, B. L., R. Jenness, 1930: *J. Dairy Sci.* 33, 896—903.
- [71] — — W. E. Geddes, 1932: *Cereal Chem.* 29, 440—447.
- [72] — — 1932: *J. amer. Chem. Soc.* 74, 3090—3093.
- [73] Lavine, T. F., 1935: *J. biol. Chem. (Am.)* 109, 141—145.
- [74] Lecloux, J., R. Kivario, J. Firket, 1927: *C. r. Soc. Biol.* 97, 1823—1825.
- [75] Lieben, F., E. Molnar, 1931: *Biochem. Z.* 230, 347—352.
- [76] Linderstrom-Lang, K., 1935: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35, 100—116.
- [77] Lucas, C. C., E. J. King, 1932: *Biochem. J.* 26, 2076—2089.
- [78] Machebœuf, M., Barbara Robert, 1935: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35, 399—411.
- [79] Mason, H. L., 1930: *J. biol. Chem. (Am.)* 86, 623—634.
- [80] Meyer, F. O. W., 1930: *Pharmaz. Zhalle Dtschld.* 89, 3—8.
- [81] Michail, D., P. Vancea, 1928: *C. r. Soc. Biol.* 99, 891—892.
- [82] Murray, jr., H. A., 1926: *J. gen. Physiol. (Am.)* 9, 621—624.
- [83] Neurath, H., A. M. Saum, 1939: *J. biol. Chem. (Am.)* 128, 347—362.
- [84] — J. P. Greenstein, F. W. Putnam, J. O. Erickson, 1944: *Chem. Rev.* 34, 157—265.
- [85] Nordin, P., E. Y. Spencer, 1932: *Cereal Chem.* 29, 29—39.
- [86] Okuda, Y., 1925: *J. Biochem. (Tokyo)* 5, 201—215 und 217—227.
- [87] Olcott, H. S., H. Fraenkel-Conrat, 1947: *Chem. Rev.* 41, 151—197; speziell S. 182—184.
- [87a] Perlzweig, W. A., G. Delrue, 1927: *Biochem. J.* 21, 1416—1418.
- [88] Peterson, R. D., C. H. Beatty, E. S. West, 1931: *Proc. Soc. exper. Biol. a. Med.* 77, 747—749.
- [89] Pratt, R., J. Dufrenoy, G. Gardner, 1930: *J. amer. pharmaceut. Assoc.* 39, 496—500.



- [90] Putnam, W. F., 1953: Chapter 9 in H. Neurath and K. Bailey, „The Proteins“, Vol. I, Part B, S. 807—892, Acad. Press Inc., Publ. New York.
- [91] Rausch, L., 1950: *Ärztl. Forsch.* 4, 1/583—1/590.
- [92] — E. J. Kirnberger, 1953: *Ärztl. Forsch.* 7, 1/459—1/466.
- [93] Rosenheim, A., und J. Davisohn, 1904: *Z. anorg. Chem.* 41, 231—248.
- [94] Rotheram, M., N. Todd, S. L. Whitcher, 1952: *Amer. J. Roentgenol.* (Nur n. Zit.)
- [95] Schöberl, A., und F. Krumey, 1938: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 71, 2361—2371.
- [96] Shacter, B., H. Supplee, C. Entenman, 1952: *Amer. J. Physiol.* 169, 499—507 und 508—510.
- [97] Shoji, J., 1927: *Fukuoka Ikwadaigaku Zasshi* 20, 6—13 (zit. n.: *Ber. ges. Physiol.* 40, 636, 1927).
- [98] Slotta, K. H., und W. Forster, 1938: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 71, 1082—1088.
- [99] Thompson, J. W., C. Voegtlin, 1926: *J. biol. Chem. (Am.)* 70, 793—800.
- [100] Tropp, C., 1939: *Z. physiol. Chem.* 262, 199—209 und 210—224.
- [101] — Lisefotte Jühling, F. Geiger, 1939: *Z. physiol. Chem.* 262, 225—242.
- [102] — F. Geiger, 1942: *Z. physiol. Chem.* 272, 121—135 und 134—143.
- [103] — W. Stoye, 1942: *Z. physiol. Chem.* 275, 80—92.
- [104] — F. Geiger, W. Stoye, 1943: *Z. physiol. Chem.* 277, 192—196.
- [105] Tunnicliffe, H. E., 1925: *Biochem. J.* 19, 194—198.
- [106] — 1925: *Biochem. J.* 19, 199—206.
- [107] Virtue, R. W., H. B. Lewis, 1934: *J. biol. Chem. (Am.)* 104, 415—421.
- [108] Voegtlin, C., J. W. Thompson, 1926: *J. biol. Chem. (Am.)* 70, 801—806.
- [109] Wels, P., 1935: *Arch. exper. Path. (D.)* 171, 480—495.
- [110] — R. Hesse, 1934: *Naturw.* 22, 648.
- [111] Wenig, K., O. Jirovec, 1938: *Biochem. Z.* 295, 405—415.
- [112] Woodward, G. E., 1935: *Biochem. J.* 27, 1411—1414.
- [113] — 1935: *Biochem. J.* 29, 2405—2412.

# **Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserwegs in pflanzlichen Kapillaren**

Von

**Theodor Butterfaß**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster in Westfalen

Mit 6 Textabbildungen

*(Eingegangen am 9. April 1956)*

Seitdem Strugger (1938 a, 1938 b, 1939 a, 1939 b, 1940 a) die hervorragende Eignung der Fluoreszenzmikroskopie für Fragen des faszikulären und extrafaszikulären Wasserstroms in pflanzlichen Geweben entdeckt hat, ist sie dazu mehrfach herangezogen worden, so von Rouschal und Strugger (1940), Rouschal (1941), Ziegenspeck (1945, 1950, 1952), Hülsbruch (1945), Steubing (1949), Bauer (1953), Pohl (1954), Strugger und Butterfaß (1955). Bei Wahl eines geeigneten Farbstoffs kann man diesen mit Recht als Anzeiger für einen möglichen Wasserstrom heranziehen. Bei der Untersuchung von extrafaszikulären Wasserströmen können sich aber die Grenzen der Methode störend bemerkbar machen und müssen berücksichtigt werden.

Weil alle pflanzlichen Gewebe Wasser enthalten und in einem fortwährenden Austausch mit ihrer Nachbarschaft stehen, kann man nur nach größeren Wasserverschiebungen fragen. Der Durchtritt von Fluorochromen mit der ungefähr zehnfachen Teilchengröße des Wassers bildet nun aus methodischen Gründen ganz zufällig den Maßstab für „viel“ oder „wenig“ Wasser, obwohl viele kleinere Poren sogar mehr Wasser durchlassen könnten als wenige größere. Der Einstrom von Wasser in eine Zelle erfolgt unter keinen Umständen durch größere Poren, sonst gäbe es kein Permeabilitätsproblem. Weil Farbstoff- und Wasserpermeabilität in diesen kleinen Dimensionen nichts miteinander zu tun haben, ist die Untersuchung „bevorzugte Zellwand- oder Plasmawegsamkeit für Wasser“ nur indirekt möglich. Die wichtigste Voraussetzung dafür ist der unmittelbare Nachweis des möglichen Wasserwegs (Strugger ab 1938).

Wo größere kompakte Wasserströme vorhanden sind, wird eine elektro-

statische Hemmung des Farbstoffs durch geeignete Wahl eines solchen vermieden. Ein unauflöslicher Zwiespalt liegt aber darin, daß der Farbstoff nicht adsorbiert werden darf, das Wasser jedoch, dessen Weg er anzeigen soll, teilweise als Quellungswasser ohne den Indikator gebunden und verschoben wird. Der beträchtliche Teil des pflanzlichen Wassers, der infolge elektrostatischer und osmotischer Kräfte im gequollenen Gel festgehalten wird, kann sich nämlich innerhalb der Solvathüllen, wohin der Farbstoff gar nicht gelangt, leicht verschieben und steht in dauerndem Austausch mit dem Wasser der Umgebung.

Mit der Verkleinerung der Fluorochrommoleküle könnten zwar feinere Poren nachgewiesen werden; gleichzeitig würde aber die Parallelität von Farbstoff- und Wasserbewegung herabgesetzt, denn das Substrat wirkt dann zunehmend auf den Farbstoff ein, vor allem über seine Gegenionen. Wenn auch die optimale Teilchengröße nach unten noch nicht erreicht ist, stehen wir letzten Endes doch vor einer grundsätzlichen Schranke des Indikatorverfahrens, die nicht allein in der Größe der Farbstoffmoleküle begründet ist.

Anläßlich von Untersuchungen über Wasseraufnahme durch oberirdische Pflanzenorgane hat sich die Frage ergeben, ob es nicht in ganz bestimmten Fällen möglich ist, für Farbstoff unwegsame Stellen in natürlichen Gelen (imprägnierte Zellwände) für ihn wegsam zu machen, um beim Gelingen zu schließen, daß sie vorher wenigstens für Wasser durchlässig gewesen sein müssen. Dabei wird vorausgesetzt, daß durch einen solchen Eingriff nur die Wegsamkeit für Farbstoff auf Grund vorhandener Poren gesteigert wird und keine neuen Öffnungen entstehen.

Dieses Ziel konnte in einem konkreten Fall sofort erreicht werden, indem der Farbstofflösung Salze zugefügt wurden. Über deren zweckmäßige Auswahl und Konzentration war aber zunächst nichts bekannt. Insbesondere war nicht im voraus zu sagen, ob Quellung oder Entquellung des Gels die Wegsamkeit für Farbstoff erhöhen würde. Modellversuche zu dieser Frage mußten eine Messung zulassen und durften nicht nur wie in der Pflanze die beiden Urteile „durchlässig“ und „nicht durchlässig“ erlauben. Solche Modellversuche sind das Ziel der vorliegenden Arbeit. Über die praktische Anwendbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf Pflanzen ist noch kein sicheres Urteil möglich (vgl. Butterfaß 1956).

Die Versuche sollen ermitteln, wie man die Wegsamkeit eines Gelatinegels für Farbstofflösung durch Zusätze von Stoffen zu dieser Lösung (nicht zum Gel, weil das in Pflanzen auch nicht möglich ist) steigern kann. Die Beschleunigung der Diffusion gegenüber einer Kontrolle wird zum Maß der Porenerweiterung für den Farbstoff gemacht.

### Voruntersuchungen

#### a) Der Farbstoff und seine Eigenschaften

In den vorwiegend negativ geladenen Zellwänden kann nur ein negativ geladener Farbstoff in Frage kommen, vor allem das von Strugger

(1939 b) erstmals und seitdem öfter in der Botanik angewandte oxyppyren-trisulfosaure Natrium (in dieser Arbeit kurz Oxyppyrentrisulfonat genannt), das nur sehr wenig adsorbiert wird, molekulardispers ist und außerordentlich stark fluoresziert. Die für die Botanik wichtigen Eigenschaften haben Strügger (1940 a), Ziegenspeck (1945) und Perner (1950) untersucht.

Es war nötig, diesen Farbstoff einer erneuten Elektrophorese zu unterwerfen, weil bei der früher in der Botanik üblichen Methode eine sehr starke pH-Verschiebung auftritt (vgl. auch Kölbl 1948), die falsche Ergebnisse hervorrufen kann. Außerdem ist inzwischen eine wichtige Arbeit über das Dissoziationsverhalten angeregter Moleküle erschienen (Förster 1950), die u. a. gerade von Oxyppyrentrisulfonat handelt, in mancher Beziehung von unserer bisherigen Ansicht abweicht und deshalb kurz referiert werden muß.

Die Sulfonylgruppen sind im überwiegenden Teil der pH-Skala dissoziiert. In den Spektren beobachtet man praktisch nur den Zustand der Oxygruppe, die oberhalb des Umschlagpunktes dissoziiert ist und unterhalb nicht. Die verschiedene Lage von Absorptions- und Fluoreszenzumschlag (nahe am Neutralpunkt bzw. um  $\text{pH} = 0$ ) wird so erklärt: Die Anregung begünstigt die Dissoziation, so daß sich dann der Umschlagpunkt auf der pH-Skala nach unten bewegt.

Prüft man den Farbstoff mit der sehr vereinfachten Anordnung für Papierelektrophorese, die in unserem Institut in Gebrauch ist und etwa der Einrichtung nach Heyer (1953; wiedergegeben bei Linskens 1955) entspricht, so zeigt sich in der Tat, daß der Farbstoff auch in einnormaler Salzsäure streng anodisch wandert und also nicht entladen wird.

Die verwendete Elektrophorese-Einrichtung läßt den pH-Wert ausreichend konstant bleiben. Da nur qualitative Schlüsse gezogen werden sollen, stört die pH-Abhängigkeit der Zelluloseladung (Kölbl 1948) nicht.

#### b) Eigenschaften der Gelatine

Hauptbestandteil der Gelatine ist das Glutin, ein Eiweißkörper, der sowohl freie Amino- als auch Carboxylgruppen enthält, die teilweise ionisiert sind; das Neutrale Molekül spielt fast keine Rolle. Das Eiweiß verhält sich also etwa wie eine Aminosäure: Im sauren Gebiet liegt ein Ion der Form  $\text{NH}_3^+\text{RCOOH}$ , um den isoelektrischen Punkt (IEP) ein solches der Form  $\text{NH}_3^+\text{RCOO}^-$ , also ein Zwitterion, und im alkalischen Gebiet ein Ion der Form  $\text{NH}_2\text{RCOO}^-$  vor. Zusätzlich tragen noch die Peptidgruppen merklich zum kolloidchemischen Verhalten der Proteine bei (Küntzel 1944).

Der isoelektrische Punkt (IEP) von Gelatine liegt bei oder etwas unterhalb von  $\text{pH} = 5$ , wie die Zusammenstellungen von Pauli und Valkó (1929, 1933), Küntzel (1944) und Grassmann und Trupke (1951) zeigen. Bei grundsätzlich anderer Herstellung kann das Produkt einen anderen IEP haben (Briefer 1929, Küntzel 1944). Er verschiebt

sich außerdem je nach Art und Konzentration anwesender Fremdionen. Neuere Arbeiten (Pouradier und Roman 1950, Pouradier, Roman und Venet 1950, Pouradier und Abribat 1950) sprechen für eine bemerkenswerte Einheitlichkeit der Gelatine. Aber auch wenn Gelatine kein einheitlicher Eiweißkörper ist (Küntzel 1944), so kann sie dennoch niemals zwei isoelektrische Punkte haben (Küntzel 1929, 1944). Trotzdem wurden für manche Eigenschaften, z. B. die Quellung, immer wieder zwei ausgezeichnete Punkte auf der pH-Skala gefunden, von denen bei der Besprechung der Diffusionsversuche noch die Rede sein wird.

Eine isoelektrische Zone im strengen Sinn tritt dann auf, wenn der Bereich der Zwitterionen ziemlich breit ist. Bei Gelatine braucht man nicht von einer isoelektrischen Zone zu sprechen.

Wird reine Gelatine in Wasser gelöst, so werden von den Carboxylgruppen mehr Wasserstoffionen abgespalten als an die Aminogruppe angelagert; die Lösung reagiert deshalb sauer. Der dann gemessene pH-Wert ist nicht der IEP, denn auf den Molekülen sind die negativen Ladungen im Überschuß. Erst durch Zusatz weiterer Wasserstoffionen wird die Ionisierung der Aminogruppe begünstigt und die der Carboxylgruppe zurückgedrängt und so der IEP erreicht. Der in einem System aus Gelatine und Wasser gemessene pH-Wert liegt also zwischen Neutralpunkt und IEP und wird in dieser Arbeit der „Eigen-pH-Wert“ des Systems genannt. 5%ige Gelatine hatte z. B. einen Eigen-pH-Wert von 5,1. Die Genauigkeit einer solchen Angabe ist aber gering. Erstens ist es nicht sicher, ob der pH-Wert im erstarrten Zustand derselbe ist wie bei der Messung (30°C, Glaselektrode), und zweitens vermindert sich mit steigender Gelatinekonzentration die Konzentration des Wassers und ändert sich damit sein Dissoziationsgrad.

Lösungen, die über reine Gelatinegele geschichtet werden, erleiden pH-Verschiebungen auf den Eigen-pH-Wert des Gels hin. Über Gelatine, die selbst auf bestimmte pH-Werte eingestellt und mit Puffern desselben pH-Wertes überschichtet wird, geht die Verschiebung vom IEP weg; von einem Eigen-pH-Wert kann man ja hier nicht mehr reden.

Von den zahlreichen Möglichkeiten der Bestimmung des IEP kommen für die Anwendung auf Pflanzen vor allem kolorimetrische Verfahren in Betracht, wie sie von Loeb (1922), Thomas und Kelly (1922), Robbins (1924, 1926), Naylor (1926), Pischinger (1926, 1927), Drawert (1937, 1938) und Strugger (1940 b) ausgearbeitet und weiterentwickelt worden sind. Wo aber, wie fast immer in Pflanzen, der pH-Wert des zu untersuchenden Stoffes nur von außen her zu beeinflussen ist, liefern diese Verfahren, wie z. B. Zeiger (1930) und Schwantes (1932) gefunden haben, nur Relativwerte.

Um die Zuverlässigkeit kolorimetrischer Verfahren im Modell nachzuprüfen, wurde aschefreie Gelatine (Nr. 2402/205 der Deutschen Gelatine-Fabriken Göppingen) mit 96%igem Alkohol titriert; im Minimum der Löslichkeit liegt der IEP. Führt man diese Titration, die sehr genau mög-

lich ist, in verschiedenen konzentrierten Pufferreihen aus und extrapoliert aus den graphisch erhaltenen, verschiedenen IEP-Werten auf unendliche Pufferverdünnung, dann erhält man den isoionischen Punkt (Sørensen, Linderström-Lang und Lund 1927), den Punkt also, wo der Ampholyt Wasserstoffionen weder aufnimmt noch abgibt (IIP). Er hängt nicht mehr von Fremdionen ab und lag bei der untersuchten Gelatine etwa bei  $\text{pH} = 4,95$ .

Einzelheiten werden in der im Botanischen Institut Münster vorliegenden Dissertation beschrieben.

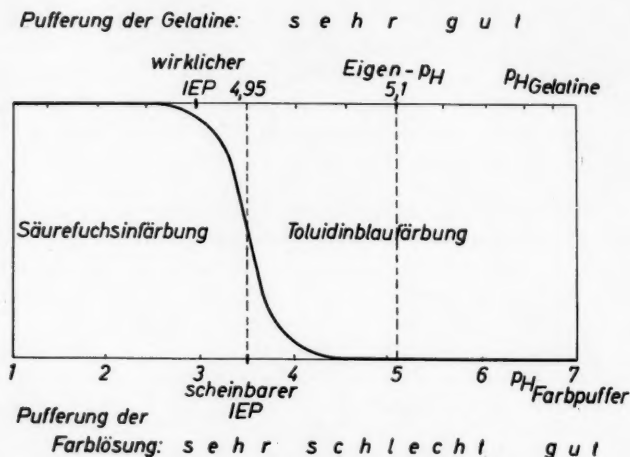


Abb. 1. Fehlerquellen der IEP-Bestimmung mit einem Farbstoffpaar.

In Essigsäure-Acetat-Puffer mit 0,01 mol. Acetat wurde der IEP bei  $\text{pH} = 4,68$  gefunden, in Phosphatpuffern dagegen: 0,01 mol. bei  $\text{pH} = 4,81$ ; 0,0025 mol. bei  $\text{pH} = 4,89$ ; 0,0005 mol. bei  $\text{pH} = 4,93$ .

Damit ist es möglich geworden, eine Kontrolle der Farbstoffpaarmethode vorzunehmen.

Die Versuchsbedingungen waren möglichst dieselben wie bei Schwan-tes (1952): In 0,05%ige Säurefuchsinlösung und 0,05%ige Toluidinblaulösung (Drawert 1937) in abgestuften 1/150 mol. Phosphatpuffern wurden Objektträger mit Tropfen erstarrter 20%iger Gelatine gestellt. Nach 2 Std. wurde 2 Std. lang mit reinen Puffern ausgewaschen. Das Ergebnis war ein „IEP“ um  $\text{pH} = 4$ , also viel zu tief. Mehrstündiges Vorbaden in reinem Puffer änderte daran nichts Wesentliches. Die Methode mit einem Farbstoffpaar gibt also auch bei unbelebten Objekten nicht die richtigen Werte an. Loeb (1922), Thomas und Kelly (1922), Pischinger (1927) und Drawert (1937) kamen zu recht zutreffenden Ergebnissen, weil sie von vornherein auch den  $\text{pH}$ -Wert des Gels verändert haben, was aber im Pflanzenversuch nicht möglich ist.

Schwantes (1952) hatte für Gelatine mit der eben erwähnten Methode einen „IEP“ bei  $\text{pH} = 3,5$  gefunden, weil nämlich der  $\text{pH}$ -Wert der Außenlösung auf diese Weise in der Gelatine nicht erreicht werden kann. Die Gelatine ist ein starker Puffer, der auf den  $\text{pH} = 5,1$  (Eigen- $\text{pH}$ -Wert) eingestellt ist; nur eine Pufferlösung dieses  $\text{pH}$ -Werts wird von der Gelatine nicht verändert. Alle anderen  $\text{pH}$ -Werte von Pufferlösungen werden in Richtung auf diesen Wert verschoben, von der sauren Seite her sehr stark, weil die Phosphatpufferung dort sehr schlecht ist, von der alkalischen Seite her weniger stark oder fast nicht, weil sie um  $\text{pH} = 7$  ein Optimum hat. In eigenen Versuchen hatte Gelatine, die 10%ig in 0,05 mol. Phosphat-HCl-Puffer von  $\text{pH} = 3,5$  aufgelöst worden war, den  $\text{pH} = 4,95$ . Diese Tatsache ist dem Schema zugrunde gelegt worden (Abb. 1).

Man könnte also z. B. einen „IEP“ um  $\text{pH} = 3,5$  finden, der einem Innen- $\text{pH}$ -Wert der Gelatine von 4,95 entspricht; dieser Innen- $\text{pH}$ -Wert könnte sogar oberhalb des wahren IEP liegen, wie es im Schema angenommen worden ist, weil die Gelatine anfangs nicht die Reaktion des IEP, sondern den höheren Eigen- $\text{pH}$ -Wert aufweist. Die  $\text{pH}$ -Konstanz einer 10%igen Gelatine ist so vielmals größer als die eines verdünnten Phosphatpuffers in seinem schlechtesten Pufferbereich (im IEP der Gelatine ist der „Puffer“ überhaupt nur verdünntes primäres Phosphat), daß von einer wirksamen Pufferung durch das Phosphat nicht die Rede sein kann.

Für die folgenden Versuche ist also wichtig: Der IEP liegt bei der verwendeten Gelatine etwas unterhalb von  $\text{pH} = 5$ ; Salze beeinflussen seine Lage. Der ausgezeichnete Punkt, auf den die Gelatine gepuffert ist, ist nicht der IEP, sondern der Eigen- $\text{pH}$ -Wert. Gelatine läßt sich durch Phosphatpuffer nur sehr beschränkt in ihrem  $\text{pH}$ -Wert beeinflussen, wenn der Puffer dem Gel von außen her geboten wird. Die Pufferung durch Phosphat ist gerade im Bereich des IEP der Gelatine besonders schlecht.

### Die Diffusionsmethodik

Ein simultaner Diffusionsversuch umfaßte höchstens 120 Glasröhrchen (einseitig geschlossen, 90 mm lang, 12 mm weit, Wandstärke 1 mm), von denen je zehn dieselbe Nummer trugen und einen Mittelwert ergeben sollten. Die benötigte Menge Gelatine (aschefreie Gelatine Nr. 2405/205 der Deutschen Gelatine-Fabriken Göppingen) wurde abgewogen, mit dem Neunfachen an dest. Wasser versetzt, 1 Std. lang vorgequollen und dann 1 Std. lang auf dem Wasserbad erwärmt. Das verdunstete Wasser wurde ersetzt. Unter öfterem Umrühren wurden je etwa 3 ml der nunmehr ganz klaren, 10%igen Gelatine in die Röhrchen gefüllt und bei Zimmertemperatur erstarren gelassen. Nach dem Erkalten wurden die Röhrchen verkorkt und in zufälliger Reihenfolge angeordnet. Dann wurden aus dest. Wasser die (maximal) zwölflei zu überschichtenden Lösungen bereitet, die alle 0,1% Oxy-pyrentrisulfonat und, außer der Kontrolle, Zusätze enthielten.

2 Std. nach dem Verkorken begann in Abständen von je 30 Sek. die Überschichtung der Gelatine mit 4 ml jeweils der Lösung, der die Nummer des Röhrchens ent-



sprach. Nach genau 1 Std. waren also alle 120 Röhrchen in der Reihenfolge der zufälligen Anordnung gefüllt.

Nun wurde die Diffusionsweite in Abständen von wieder je 30 Sek. im UV-Licht mit Hilfe eines Horizontalmikroskops an der äußersten Farbfront auf 0,1 mm genau abgelesen, beginnend mit dem ersten Röhrchen, das vor genau 1 Std. überschichtet worden war. Die Messung geschah so: Einstellen der Farbfront auf die Mitte des

Okularmikrometers, Ablesen außen am Nonius; Einstellen auf den Gelatimeniskus, Ablesen außen am Nonius; Notieren jeder Ablesung, nicht jedoch der Nummer des Röhrchens. Nach längerer Übung gelingt dies alles in 30 Sek.

Jeder Versuch ist auf diese Weise nach genau 1 Std. abgelesen worden. Psychologische Momente waren ausgeschaltet, denn nach dem Erkalten waren die Beschriftungen der Röhrchen nach hinten gedreht worden; erst nach Beendigung des ganzen Versuchs wurden die Nummern der Röhrchen in der abgelesenen Reihenfolge ins Protokoll eingetragen und die Diffusionsweiten ausgerechnet. Die Art der überschichteten Lösung war also beim Ablesen nicht bekannt. Durch die zufällige Anordnung glichen sich auch kleine Temperaturschwankungen ( $\pm 0,5^\circ \text{C}$ ) oder andere von der Zeit abhängige Einflüsse (Altern des Gels) aus. Weil die Diffusionsweite aber dennoch etwas schwankte, wurden meist zehn Röhrchen als Kontrolle mitgeführt und die Ergebnisse darauf bezogen. Unterschiede in den Diffusionsstrecken unter

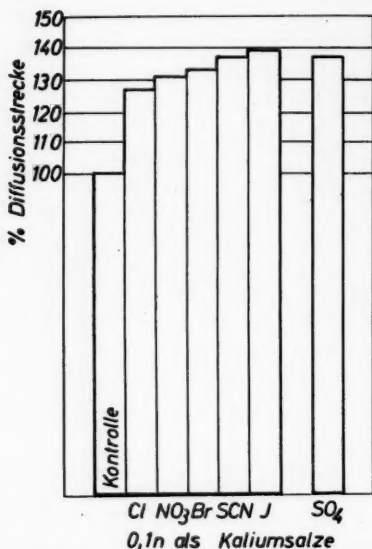


Abb. 2. Die relative Beeinflussung der Diffusion von Oxypyrentrisulfonat durch Anionen.

möglichst gleichen Bedingungen zu verschiedener Zeit überstiegen 2% der jeweiligen Kontrolle nur sehr selten und blieben damit weit unter den durch die systematischen Einflüsse hervorgerufenen Änderungen. Der mittlere Fehler einer simultanen Versuchsreihe überstieg 0,5% nie.

Diese Art der Versuchsanstellung hat den Vorteil, mit einfachsten Mitteln einigermaßen gleichzeitig gewonnene und deshalb gut vergleichbare Ergebnisse für einen kurzen Zeitraum zu liefern.

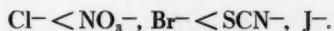
Bei zehn Parallelversuchen waren Mehrfachablesungen eines Versuchs unnötig, denn die Ablesegenauigkeit überstieg die Versuchsgenauigkeit wesentlich.

Wo es angebracht war, wurden die Ergebnisse auf gesicherte Unterschiede (mit mehr als 95% Wahrscheinlichkeit) geprüft. Wegen der Berechnung sei auf die Lehrbücher der Statistik verwiesen.

### Die Diffusionsversuche

In den untersuchten Konzentrationen steigerten sämtliche Salze die Diffusionsgeschwindigkeit von Oxypyrentrisulfonat, die ohne Zusatz bei

pH=5,5 etwa 1,6 mm in der ersten Stunde betrug, in verschiedenem Maß Abb. 2–4). Die einwertigen Anionen (Abb. 2) steigerten in der Reihenfolge



Die äquivalente Sulfatwirkung entsprach der des Rhodanids.

Kationen (Abb. 3) steigerten die Diffusion des Farbstoffs in der Reihenfolge:

0,1 n:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  Nur die Wirkung der Endglieder war gesichert verschieden. ( $\text{Li}^+ < \text{K}^+$ ).

0,3 n:  $\text{Li}^+ < \text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ . Die Wirkung von  $\text{Li}^+$  war gegen die aller anderen Ionen gesichert verschieden.

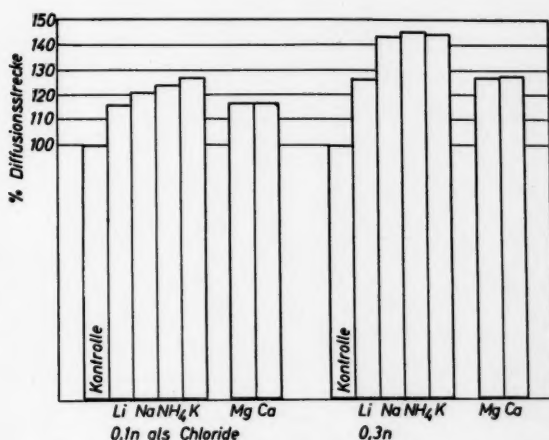


Abb. 3. Die relative Beeinflussung der Diffusion von Oxypyrentrisulfonat durch Kationen.

$\text{Mg}^{++}$  und  $\text{Ca}^{++}$  entsprachen in beiden Fällen etwa dem  $\text{Li}^+$ ; der pH-Wert lag nur wenig tiefer.

Aus Abb. 4 ist zu entnehmen, welchen Einfluß der pH-Wert auf die Diffusionsstrecke hat. Die Minima bei pH=5 und pH=7 sind als solche gesichert.

Wie weitere Versuche, die hier nicht wiedergegeben werden sollen, gezeigt haben, dominiert der Einfluß des pH-Werts so sehr, daß es im Rahmen der Versuchsgenauigkeit gleichgültig ist, ob in Puffergemischen das Phosphat (wie es üblich ist) oder das Kalium konstant gehalten wird. Auch der Salzgehalt von Leitungswasser (Abdampfdruckstand 0,06%) spielt keine Rolle gegenüber dem veränderten pH-Wert, denn säuert man eine Farbstofflösung in Leitungswasser an, bis sie den pH-Wert einer Lösung in

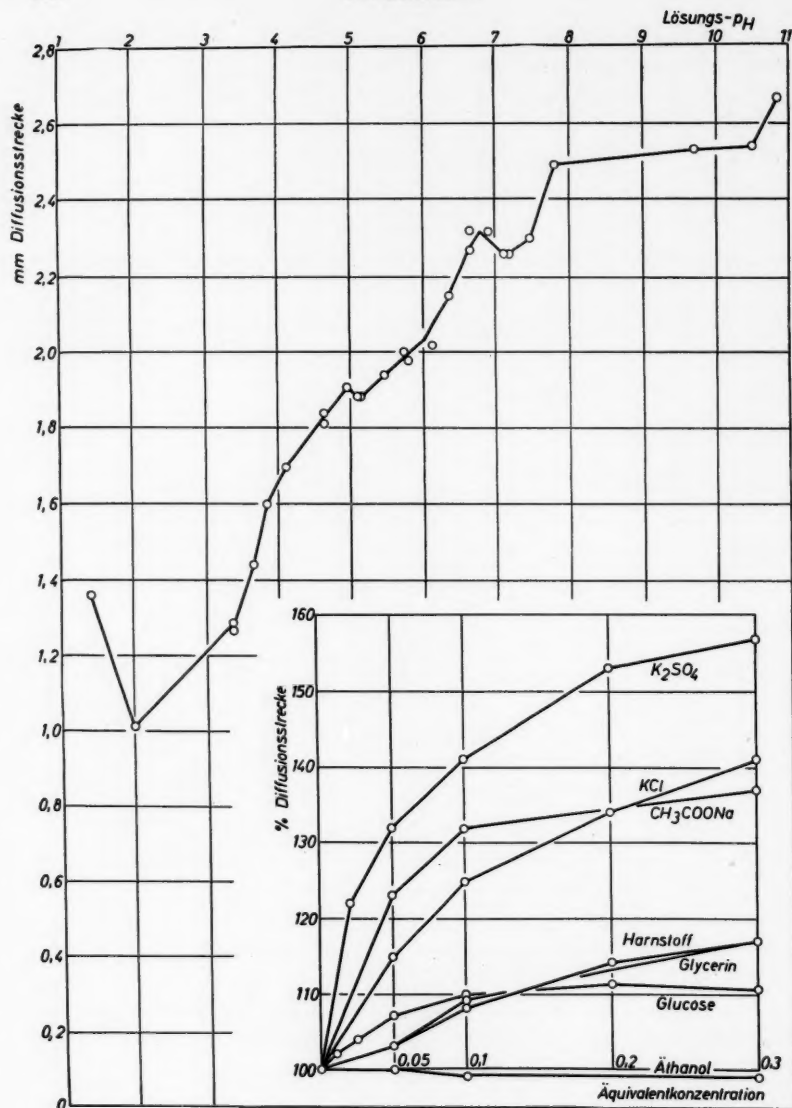


Abb. 4. Oben: Die absoluten Diffusionsstrecken von Oxypyrentrisulfonat in 0,05 mol. Phosphat-HCl-Puffern. Unten: Die relative Beeinflussung der Diffusion von Oxypyrentrisulfonat durch Leiter und Nichtleiter verschiedener Konzentration. (Die starke Acetatwirkung ist teilweise nur eine Folge des durch Hydrolyse bedingten hohen pH-Werts.)

dest. Wasser angenommen hat, so vermindert sich die Diffusionsstrecke genau auf den Wert der Lösung in dest. Wasser.

Viele Autoren, z. B. Pauli und Valkó (1929), Brauner (1930), Härtel (1950 a, 1950 b, 1951) und Frey-Wyssling (1953) berichteten, daß sich die Wirkung von Ionenreihen auf bestimmte Eigenschaften von Ampholyten auf beiden Seiten des IEP umgekehrt verhält. Um nachzuprüfen, ob auch hinsichtlich der Diffusionssteigerung eine solche Inversion eintritt, wurde das Salztupel LiCl, KCl und KJ in 0,1 n Lösungen und 0,05 mol. Phosphatpuffern vergleichend diffundieren gelassen (Abb. 5, 6). Von einer Umkehr ist nicht die Rede (vgl. aber Besprechung!).

Anelektrolyte enthalten eine den Salzen ähnliche, schwächere Wirkung (Abb 4); unter den geprüften Stoffen macht lediglich Äthanol eine Ausnahme und verhält sich indifferent. Glucose läßt bei hoher Konzentration keine Steigerung mehr erkennen. (Über 0,5 mol. Glucose hemmt sogar, wie Vorversuche ergeben haben; so hohe Konzentrationen wurden nicht weiter geprüft.)

Die mitgeteilten Ergebnisse mit organischen Stoffen lassen sich nicht verallgemeinern. So erfolgte in Vorversuchen beim Zusatz von Netzmitteln schon in starker Verdünnung eine Hemmung. Dasselbe haben Bromberg und Malzeva (1950) bei Igeponzusatz gefunden. Weil es in dieser Arbeit nur auf eine Steigerung ankam, wurde die Hemmung nicht weiter verfolgt.

### Besprechung der Diffusionsversuche mit Zusätzen

Bestätigt wurden die Befunde von Mommsen (1926), Pischinger (1927), Drawert (1937) und Bromberg und Malzeva (1950), daß ein negativ geladener Farbstoff im sauren Bereich langsamer diffundiert als im alkalischen, wenn man von den unphysiologischen Extremen absieht.

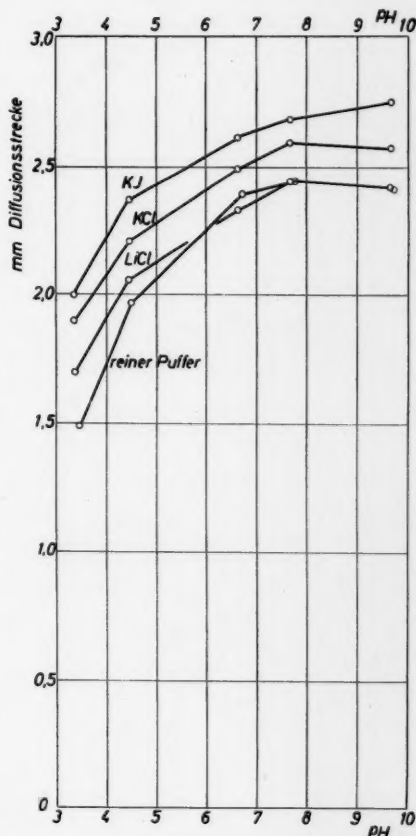


Abb. 5. Die absoluten Diffusionsstrecken von Oxyphyrentrisulfonat bei Zusatz von 0,1 n Salzen zu 0,05 mol. Phosphat-HCl-Puffern verschiedener pH-Stufen.

Nach herkömmlicher Ansicht ist dafür die verschieden starke Adsorption durch das umgeladene Gel verantwortlich. In gleicher Richtung, wenn auch schwächer, wirkt die wachsende Ionenstärke der äquimolaren Puffermischungen. Darüber hinaus treten aber, wie aus dem Schaubild hervorgeht, zwei Maxima und zwei Minima in der Nähe von  $\text{pH} = 5$  und  $\text{pH} = 7$  auf. Aus ähnlichen Extremen in Quellungskurven wurde in der Literatur wiederholt auf einen zweiten IEP geschlossen. K ü n t z e l (1929, 1944) zeigte

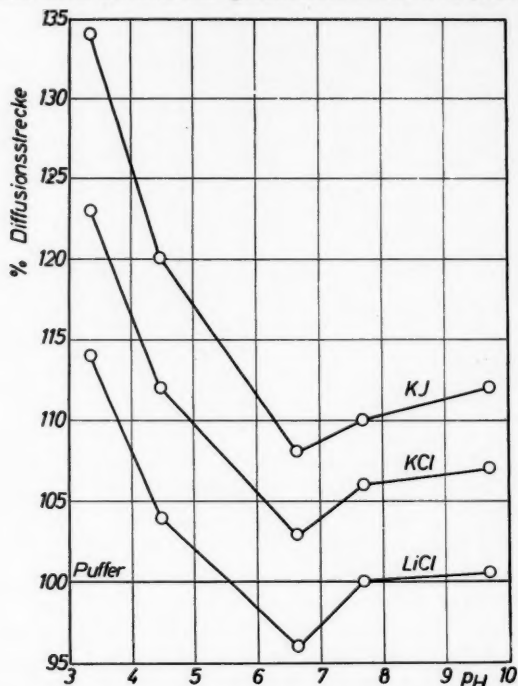


Abb. 6. Wie Abb. 5, aber relative Diffusionsstrecken, bezogen auf reinen Puffer ohne Salzzusatz.

aber überzeugend, daß kein Stoff zwei isoelektrische Punkte haben kann, und nahm an, daß man eine Ursache in der Gelatine gesucht habe, die tatsächlich in der Dissoziation der dreibasigen Phosphorsäure liege. Entgegen dieser Ansicht traten nach R u d s i t (1930; von K ü n t z e l 1944 nicht zitiert) die beiden ausgezeichneten Punkte der Quellung auch dann auf, wenn der gewünschte pH-Wert nur mit HCl und NaOH eingestellt worden war. R u d s i t (1930) kam in Übereinstimmung mit seinen Versuchen zur theoretischen Möglichkeit mehrerer Extreme der Gelatinequellung im mittleren pH-Gebiet, wozu er weder die Dissoziation der Phosphorsäure noch den IEP brauchte; vor allem sprach er nicht von einem zweiten IEP. Wenn auch nicht alle Annahmen R u d s i t s stichhaltig sein mögen und er vor allem

den Salzgehalt seiner Gelatinesorten nicht in Betracht gezogen hat, so können doch kaum alle diese Sorten so viel Phosphat enthalten haben, daß man daraus die eigenartigen Kurven deuten könnte.

Drawert (1937) fand keinen unmittelbaren Zusammenhang der Diffusionsgeschwindigkeit mit der Quellung; trotzdem können sich dieselben Einflüsse, welche die Quellungskurven zustande bringen, auch hier bemerkbar machen. Die Quellungskurven Rudsits (1930) ähneln in ihrem Charakter so sehr dem hier mitgeteilten Schaubild der pH-Abhängigkeit (Abb. 4), daß man einen inneren Zusammenhang wohl annehmen darf. Daß eine starke Schwankung auch ohne die Mitwirkung eines IEP zustande kommen kann, scheinen die zweiten Extreme in der Nähe des Neutralpunkts anzudeuten. Andererseits kann die Änderung des pH-Werts in der Gelatine nur gering sein. Das Intervall zwischen  $\text{pH} = 5$  und  $\text{pH} = 7$  der Lösung ist also in der Gelatine viel kleiner. Während der erste Punkt dort tatsächlich um  $\text{pH} = 5$  liegt (schlechte Pufferung der Außenlösung!), kann der zweite nur wenig höher liegen. Es muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, wie nahe die beiden Punkte in der Gelatine beisammen liegen und ob sie vielleicht dem IEP und dem Eigen-pH-Wert entsprechen können. In den Bereich der ersten Schwankung fallen IEP, IIP, Eigen-pH-Wert, schlechteste Pufferwirkung der Phosphate und schließlich noch ein Quellungsminimum, das Rudsit (1930) ohne alle diese Punkte zu deuten versuchte. Angesichts dieser Kompliziertheit kann noch nichts Genaueres ausgesagt werden.

Ein Zusatz von Phosphat zur Gelatine bis zum Erreichen einer ganz bestimmten Reaktion wurde unterlassen; erstens kann man auch in Pflanzen nicht so vorgehen, und zweitens wäre die Phosphat-HCl-Konzentration sehr hoch geworden.

Daß die Kationenwirkung in den angewandten Konzentrationen der Adsorptionsreihe folgt (Abb. 3), spricht für eine Steigerung der Farbstoffdiffusion durch relative Entquellung. Bei Koniferennadeln hat Eisenzopf (1952) im vierstündigen Versuch für die Wasseraufnahme die umgekehrte Reihenfolge gefunden. Das legt den Gedanken nahe, daß erhöhte Farbstoff- mit herabgesetzter Wasserwegsamkeit verbunden sein könnte. Würde demnach Quellung die Durchlässigkeit für Wasser steigern, so würden sich die freien Porenquerschnitte für Lösungen verkleinern; Stoffe, die nicht in die Solvathüllen eindringen können, wären gehemmt. Allerdings scheinen die Anionen die Farbstoffdiffusion ebenso wie die Wasseraufnahme zu steigern. Vielleicht macht sich hier der Ladungssinn der Farbstoffionen oder die Salzkonzentration geltend. Vergleiche mit den Arbeiten von Härtel (1947, 1950 a, 1950 b, 1951) und Eisenzopf (1952) sind nur bedingt zulässig, weil vor allem Härtel z. T. ganz andere Konzentrationen verwendete.

Da die Salzwirkung auf ein Kolloid schon an sich sehr komplex ist (vgl. Küntzel 1944) und im vorliegenden Fall die Diffusion selbst geladener Teilchen in dieses Kolloid hinzukommt, ist eine befriedigende Deutung vorerst nicht möglich.

Die relative Steigerung der drei geprüften Salze in Abhängigkeit vom pH-Wert geht durch ein Minimum (Abb. 6). Wie es zu diesem Minimum und insbesondere bei LiCl sogar zu einer Hemmung gegenüber der Pufferkontrolle kommen kann, ist noch nicht bekannt. Eingangs wurde gezeigt, wie schwer es ist, den pH-Wert eines Gelatinegels von außen her zu verändern. Wahrscheinlich entspricht auf Abb. 6 das Minimum dem Eigen-pH-Wert, und der IEP wird überhaupt nicht unterschritten, auch bei einem Lösungs-pH von 3,5 nicht; es wäre dann verständlich, warum sich die Ionenreihen nicht umkehren, was man sonst eigentlich erwarten sollte. Das Minimum wird ohnehin auf Abb. 6 nur qualitativ erfaßt; um seine genaue Lage zu ermitteln, wären die Abstände der pH-Stufen stark zu verkleinern.

Erstaunlich ist bei allen Versuchen mit variablem pH-Wert, daß sich trotz der geringen Beeinflußbarkeit der Gelatine die Diffusionsstrecken derartig steil ändern.

Auch die Versuche mit Nichtelektrolyten können vorerst nicht erklärt werden. Friedman (1930 a, 1930 b) und Friedman und Shearer (1934) erhielten den vorliegenden recht ähnliche Ergebnisse bei der Beeinflussung der Diffusion von Harnstoff durch Glycerin, Glucose u. a. in Gelatine- und Agargelen. Bei einer zukünftigen Deutung muß berücksichtigt werden, daß polare Stoffe, ionisiert oder nicht, die Quellung stark fördern können (Katz 1933, Kohler 1936) und z. B. dabei schon beim Rhodanid nach Katz (1933) der Ioneneinfluß zurücktritt. Goubarew und Moiseenko (1936) fanden eine pH-abhängige Bindung von Glucose an Eiweiß.

Vielleicht werden analoge Versuche mit einem positiv geladenen Farbstoff weitere Aufklärung bringen.

### Zusammenfassung

1. Fluorochrome wie auch Hellfeldfarbstoffe sind auf die Untersuchung des Wasserwegs in sehr engen pflanzlichen Kapillaren deswegen nur begrenzt anwendbar, weil die Farbstoffmoleküle sehr groß sind und physikalisch-chemische Eigenheiten gegenüber dem Wasser besitzen. Es ist grundsätzlich ausgeschlossen, mit diesem Verfahren Wasserströmungen durch Plasmamembranen hindurch nachzuweisen.

2. Die Wegsamkeit eines Gelgerüsts für Farbstoff kann erhöht werden, wenn man der Lösung Salze oder Anelektrolyte beimengt. Gesetzmäßigkeiten dieser Beeinflussung wurden am Gelatinemodell studiert. Dabei diente die beschleunigte Farbstoffdiffusion in ein Gelatinegel als Maßstab der Erweiterung des freien Porenquerschnitts; so ergaben sich Zahlenwerte für den Einfluß der Zusätze auf die Durchlässigkeit für Farbstoff.

3. Ein geeigneter Farbstoff ist das Fluorochrom Oxyppyrentrisulfonat. Es ist bei allen physiologischen pH-Werten stark negativ geladen. Das Zustandekommen von Absorptions- und Fluoreszenzumschlag und ihr Zusammenhang mit der Dissoziation der Oxygruppe wurden an Hand der Literatur diskutiert.

4. Als Voraussetzung zu den Modellversuchen wurde gezeigt, wie man



den isoelektrischen Punkt (IEP) der Gelatine bestimmen kann, welche Fehler dabei unterlaufen können, welcher Zusammenhang zwischen dem IEP und dem Eigen-pH-Wert besteht (dem pH-Wert, den ein System aus Wasser und Gelatine besitzt) und welche Rolle diese Punkte spielen.

5. Die Diffusionsstrecken von Oxypyrentrisulfonat in ein 10%iges Gelatinegel können durch die höchstens 0,3 molar angewandten Zusätze zur Farbstofflösung gesteigert werden. Anionen und Kationen folgen dabei den Adsorptionsreihen; die Diffusionsstrecke des Farbstoffs steigt also durch relative Entquellung. Harnstoff, Glucose und Glycerin steigern die Diffusionsgeschwindigkeit weniger stark als Salze; Athanol verhält sich indifferent.

6. Mit steigendem pH-Wert der Farbstofflösung steigen auch die Diffusionsstrecken. Sie sind bei  $\text{pH} = 8$  etwa 2,5mal so groß wie bei  $\text{pH} = 2$ . Um  $\text{pH} = 5$  und  $\text{pH} = 7$  der Lösung liegen zwei Schwankungsbereiche, deren Bedeutung und wahre Lage innerhalb der Gelatine vorerst nur vermutet werden können.

7. Auch der Einfluß des pH-Werts auf die Steigerung der Diffusion durch Salze wurde untersucht. Eine Umkehr der Reihen unterhalb des IEP der Gelatine war zwar nicht festzustellen; es ist aber fraglich, ob der IEP innerhalb der Gelatine tatsächlich unterschritten werden konnte. Die Steigerung der Salze gegenüber dem jeweiligen Puffer ist im sauren Bereich besonders groß, erreicht unterhalb des Neutralpunkts ein Minimum und steigt dann wieder an. Im Minimum hemmt ein Zusatz von 0,1 *n* LiCl zu 0,05 mol. Phosphatpuffer die Diffusion gegenüber dem reinen Puffer, während KCl und besonders KJ noch steigern.

8. Die Anwendung von Salzzusätzen, um enge pflanzliche Kapillarsysteme für Farbstofflösung noch eben durchlässig zu machen und so auf ihre vorherige Wegsamkeit für Wasser zu schließen, bildet den Inhalt einer weiteren Veröffentlichung.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strugger, danke ich herzlich für sein Interesse an der Arbeit.

Den Deutschen Gelatine-Fabriken Göppingen danke ich für die asche-freie Gelatine.

#### Literatur

- Bauer, L., 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. *Planta* 42, 367—451.  
 Brauner, L., 1930: Untersuchungen über die Elektrolyt-Permeabilität und Quellung einer leblosen natürlichen Membran. *Jb. wiss. Bot.* 23, 513—632.  
 Briefer, M., 1929: Photometric and electrometric measurements of gelatin behavior. *Industr. Engineering Chem.* 21, 266—270.  
 Bromberg, A. V., und O. S. Malzeva, 1950: Diffusion von Farbstoffen in Gelatinegelelen. II. Der Einfluß der Sorption auf die Diffusionsgeschwindigkeit in Gelen. *Kolloidnyj Zhurnal* 12, 9—16 (russisch).  
 Butterfaß, Th., 1956: Fluoroskopische Untersuchungen an Keulenhaaren von *Vicia faba* L. und *Phaseolus coccineus* L. *Protoplasma* 47, 415—428.

- Drawert, H., 1937: Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Plastidenfärbung mit Säurefuchsin und Toluidinblau in fixierten pflanzlichen Zellen. *Flora* 131, 341—354.
- 1938: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. *Flora* 132, 91—124.
- Eisenzopf, R., 1952: Ionenwirkungen auf die kutikuläre Wasseraufnahme von Koniferen. *Phyton (Ann. rei bot.)* 4, 149—159.
- Förster, Th., 1950: Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle. *Z. Elektrochem.* 54, 42—46.
- Frey-Wyssling, A., 1953: Submicroscopic morphology of protoplasm. Amsterdam, Houston, London, New York. 411 S.
- Friedman, L., 1930 a: Diffusion of non-electrolytes in gelatin gels. *J. Amer. Chem. Soc.* 52, 1305—1310.
- 1930 b: Structure of agar gels from studies of diffusion. *J. Amer. Chem. Soc.* 52, 1311—1314.
- and W. N. Shearer, 1934: The effect of non-electrolytes upon diffusion in gelatin gels. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 1323—1324.
- Goubarew, E., et G. Moiseenko, 1936: L'adsorption du glucose par l'albumine. *Bull. Soc. chim. biol.* 18, 769—779.
- Grassmann, W., und J. Trupke, 1951: Eiweißstoffe, allgemeiner Teil. In *Flaschenträger-Lehnartz, Physiologische Chemie*, I. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Härtel, O., 1947: Über die pflanzliche Kutikulartranspiration und ihre Beziehungen zur Membranquellbarkeit. *S.ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl.* 156, I, 57—86.
- 1950 a: Wirkungen von Ionen auf die Wasserdurchlässigkeit des primären und sekundären Hautgewebes pflanzlicher Organe. *Protoplasma* 39, 364—385.
- 1950 b: Neues über die Kutikulartranspiration. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 63 (31).
- 1951: Ionenwirkung auf die Kutikulartranspiration von Blättern. *Protoplasma* 40, 107—136.
- Heyer, W., 1953: Über die Papierelektrophorese von Nucleinsäuren aus Zellen des Aszites-Tumors der Maus. Dissertation Münster. 43 S.
- Hülsbruch, Magdalena, 1945: Fluoreszenzoptische Untersuchungen über den Wasserweg in der Wurzel. *Planta* 34, 221—248.
- Katz, J. R., 1933: Quellungsfördernde organische Substanzen. *Naturw.* 21, 339—340.
- Kohler, D., 1936: Rôle des non-electrolytes dans le phénomène d'imbibition. *C. r. Soc. biol.* 122, 1050—1052.
- Kölbel, H., 1948: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. *Z. Naturforsch.* 3 b, 442—453.
- Küntzel, A., 1929: Untersuchungen über die Quellung der Gelatine in wässrigen Lösungen von Säuren, Basen und Salzen und deren Gemischen. *Biochem. Z.* 209, 326—437.
- 1944: Physikalische Chemie und Kolloidchemie der Eiweißkörper unter besonderer Berücksichtigung des Kollagens. *Handb. Gerbereichem. Lederfabrikation*, hrsg. v. W. Graßmann. Bd. I, 1. Teil, S. 511—619.
- Linskens, H. F., 1955: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin, Göttingen, Heidelberg. 253 S.

- Loeb, J., 1922 (1924): Proteins and the theory of colloidal behavior. New York 1922. Deutsche umgearbeitete Ausgabe: Die Eiweißkörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen. Berlin 1924. 298 S.
- Mommsen, H., 1926: Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Diffusion von Farbstoffen in eine Gelatinegallerte. Biochem. Z. 168, 77—87.
- Naylor, E. E., 1926: The hydrogen-ion concentration and the staining of plant tissue. Amer. J. Bot. 13, 263—275.
- Pauli, W., and E. Valkó, 1929: Elektrochemie der Kolloide. Wien. 647 S.
- — 1935: Kolloidchemie der Eiweißkörper. 2. Aufl. Dresden und Leipzig. 353 S. (Handb. Kolloidwiss., hrsg. v. Wo. Ostwald, Bd. IV.)
- Perner, E. S., 1950: Die intravitale Aufnahme und Speicherung sulfosaurer Fluorochrome durch die obere Zwiebelschuppenepidermis von *Allium cepa*. Protoplasma 39, 180—205.
- Pischinger, A., 1926: Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Z. Zellforsch. usw. 3, 169—197.
- 1927: Diffusibilität und Dispersität von Farbstoffen und ihre Beziehung zur Färbung bei verschiedenen H-Ionen-Konzentrationen. Z. Zellforsch. usw. 5, 347—385.
- Pohl, R., 1954: Die fluoreszenz-mikroskopische Analyse des Wasserweges in der *Avena*-Koleoptile. Z. Bot. 42, 63—72.
- Pouradier, J., et Janine Roman, 1949: Point isoélectrique des gélatines fractionnées. C. r. Acad. sci. 229, 1325—1326.
- — et A.-M. Venet, 1950: Contribution à l'étude de la structure des gélatines. III. Variation des propriétés chimiques avec la masse moléculaire. J. chim. phys. et phys.-chim. biol. 47, 887—891.
- et M. Abribat, 1950: Dissolution de la gélatine dans l'eau froide. Bull. Soc. chim. biol. 32, 947—951.
- Robbins, W. J., 1924: Isoelectric points for the mycelium of fungi. J. gen. Physiol. (Am.) 6, 259—271.
- 1926: The isoelectric point for plant tissue and its importance in absorption and toxicity. Univ. Missouri Studies 1, 3—60.
- Rouschal, E., 1941: Beiträge zum Wasserhaushalt von Gramineen und Cyperaceen. I. Die faszikuläre Wasserleitung in den Blättern und ihre Beziehung zur Transpiration. Planta 32, 66—87.
- und S. Strugger, 1940: Der fluoreszenzoptisch-histochemische Nachweis der kutikulären Rekretion und des Salzweges im Mesophyll. Ber. dtsch. bot. Ges. 58, 50—67.
- Rudsit, K., 1950: Über allgemeinere Gesetzmäßigkeiten der Gelatinequellung in Elektrolytlösungen. Kolloid-Z. 53, 205—218.
- Schwantes, H. O., 1952: Färbungsanalytische Untersuchungen zur Lage des isoelektrischen Punktes der Zellbestandteile in wachsenden Zellen und Geweben. 1. Untersuchungen an Pilzmycelien. Protoplasma 41, 382—414.
- Sörensen, S. P. L., K. Linderström-Lang, and Ellen Lund, 1927: The influence of salts upon the ionisation of egg albumin. J. gen. Physiol. (Am.) 8, 543—599.
- Steubing, Lore, 1949: Beiträge zur Tauwasseraufnahme höherer Pflanzen. Biol. Zbl. 68, 252—259.
- Strugger, S., 1958 a: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 152, 253—304.

- Strugger, S., 1938 b: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 1. Mitt. Die Methode und die ersten Beobachtungen *Flora* 133, 56—68.
- 1939 a: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 2. Die Eigenschaften des Berberinsulfates und seine Speicherung durch lebende Zellen. *Biol. Zbl.* 59, 274—288.
- 1939 b: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 3. Untersuchungen an *Helxine Soleirolii* Req. *Biol. Zbl.* 59, 409—442.
- 1940 a: Studien über den Transpirationsstrom im Blatt von *Secale cereale* und *Triticum vulgare*. *Z. Bot.* 35, 97—115.
- 1940 b: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenteile. *Z. Naturw. (Jena)* 73, 97—134.
- und Th. Butterfaß, 1955: Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse des extrafasciculären Wasserweges in der *Avena*-Koleoptile. *Planta* 45, 549—556.
- Thomas, A. W., and M. W. Kelly, 1922: The iso-electric point of collagen. *J. Amer. Chem. Soc.* 44, 195—201.
- Zeiger, K., 1930: Der Einfluß von Fixationsmitteln auf die Färbbarkeit histologischer Elemente. Versuche mit hochdispersen Farbstoffen. *Z. Zellforsch. usw.* 10, 481—510.
- Ziegenspeck, H., 1945: Fluoroskopische Versuche an Blättern über Leitung, Transpiration und Abscheidung von Wasser. *Biol. generalis* 18, 254—326.
- 1950: Fluoroskopische Versuche über die Durchlässigkeit der Endodermen der Stengel und Wedel der Gefäßkryptogamen und deren Vorkommen im Vergleich mit stomatären Hydathoden und Wassergruben. *Biol. generalis* 19, 211—225.
- 1952: Vorkommen und Bedeutung von Endodermen und Endodermoiden bei oberirdischen Organen der Phanerogamen im Lichte der Fluoroskopie. *Mikroskopie* 7, 202—208.

#### Anmerkung bei der Korrektur:

Hülsbruch nimmt im eben erschienenen III. Band des *Ruhlandschen Handbuchs der Pflanzenphysiologie* auf Seite 524 daran Anstoß, daß Fluorochrome auch heute noch zur Untersuchung des Wasserweges herangezogen werden, obwohl Hülsbruch (1945) in Wurzeln gefunden hatte, daß sich Berberinsulfat auch entgegen einer Wasserströmung ausbreiten könne. „Die zum Beweis der erweiterten Kohäsionstheorie entscheidenden Versuche Struggers ... sind mit Berberinsulfat ausgeführt und fallen somit ebenfalls unter diese Kritik.“

Es ist der Autorin entgangen, daß Strugger schon 1939 b das Oxy-pyrentrisulfonat als viel besser geeigneten Farbstoff eingeführt hat, um die Wegsamkeit der Zellwände nachzuweisen, und daß dieser Farbstoff seither öfter dazu benutzt worden ist. Es ist nicht gerechtfertigt, die mit dem weniger geeigneten Farbstoff durchgeführten Versuche als die entscheidenden anzusehen und die übrigen überhaupt nicht zu erwähnen. Wenn auch in der vorliegenden Arbeit vor der kritiklosen Anwendung der Fluoroskopie gewarnt wird, so bleibt die Methode doch weiterhin für die Untersuchung möglicher Wasserwege, auch im Parenchym, ein wertvolles Hilfsmittel.

Anschrift des Verfassers: Dr. Theodor Butterfaß, Münster/Westf., Schloßgarten 3, Botanisches Institut der Universität.

# Fluoroskopische Untersuchungen an Keulenhaaren von *Vicia faba* L. und *Phaseolus coccineus* L.

Von

**Th. Butterfaß**

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität,  
Münster in Westfalen

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. April 1956)

Haberlandt (1894 a, 1894 b, 1895, 1897, 1924) faßte die Keulenhaare von *Phaseolus coccineus* L. (= *Ph. multiflorus* Willd.) als Wasserdrüsen auf und nahm an, daß sie auch umgekehrt Wasser aktiv aufsaugen könnten. Während nach anfänglicher Ablehnung (Nestler 1896, Spanjer 1898, Burgerstein 1904) schließlich allgemein anerkannt wurde, daß es sich tatsächlich um Wasserdrüsen handelt (Nestler 1899 a, 1899 b, Lepeschkin 1906, 1923, Borchert 1910, Burgerstein 1920, Fentzke 1920), ist die aktive Wasserabsorption nie bewiesen, dagegen von Burgerstein (1904) und Krause (1935) abgestritten worden.

Die Stielzelle der Keulenhaare von *Vicia faba* und *Phaseolus coccineus* ist in Form eines breiten Rings stark verdickt und kutinisiert (Abb. 3). Vielfach abgewandelt sind ähnlich gelagerte, verstärkte Kutinisierungen anscheinend bei allen Drüsenhaaren höherer Pflanzen vorhanden (Netolitzky 1932). Ihre Funktion ist unbekannt. Haberlandt (1894 a, 1894 b, 1895, 1897, 1924) hielt diesen Ring bei *Phaseolus* für eine Versteifung, Ziegenspeck (1945) dagegen in Analogie zum Casparyschen Streifen der Endodermis für eine Sperre in der Wand, die den Weg des Wasserstroms hier unterbricht und durch das Plasma zwingt. Durch diesen Ring können nämlich Fluorochrome gewöhnlich nicht durchtreten. Ziegenspeck (1952) ließ aber offen, ob in Endodermen nicht doch noch eine Durchlässigkeit wenigstens für Wasser vorhanden sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird nach der vermuteten Wasserwegsamkeit der imprägnierten Stelle von Keulenhaaren gesucht. Zuerst werden verschiedene Fluorochrome erprobt; dann wird den geeigneten Farbstofflösungen ein Salz beigemischt, um durch die Quellungsänderung der Kapillaren eine erhöhte Wegsamkeit für Farbstoff zu erreichen. Dabei wird vorausgesetzt,

daß durch einen solchen Eingriff nur die Wegsamkeit für Farbstoff auf Grund vorhandener Kapillaren gesteigert wird und keine neuen Poren entstehen. Gesetzmäßigkeiten dieser Beeinflussung wurden in einer besonderen Arbeit am Modell studiert (Butterfaß 1956). Falls der Durchtritt von Farbstoff gelingt, so konnten die nur etwa ein Zehntel so großen Wassermoleküle sicherlich schon vorher durchtreten; die Wand wäre somit für Wasser auch an der kutinisierten Stelle wegsam.

Zunächst müssen einige Angaben über die Eigenschaften der zu verwendenden Farbstoffe gemacht werden.

### Voruntersuchungen

Die in unserem Institut gebräuchliche Anordnung zur Papierelektrophorese von Farbstoffen entspricht ungefähr derjenigen nach Heyer (1953) und wurde für den vorliegenden Zweck modifiziert (Abb. 1). Der Haupteinwand Kölbels (1948), daß

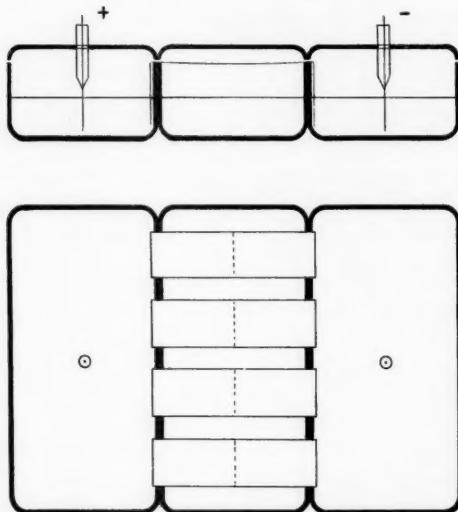


Abb. 1. Die benutzte Anordnung zur Papierelektrophorese.

sich bei verschiedenen pH-Werten auch die elektrischen Eigenschaften der Zellulose ändern und deshalb keine quantitative Auswertung erlaubt sei, ein Einwand, der ebenso gegen die hier benutzte wie die von Kölbels (1948) abgelehnte Anordnung erhoben werden kann, ist grundsätzlich richtig. Mit der nötigen Kritik sind aber relativ-quantitative Aussagen durchaus möglich.

Die auf Abb. 1 erkennbaren vier gleichzeitig eingelegten Papierstreifen (Chromatographiepapier Nr. 2043 b von Schleicher & Schüll, Faserrichtung quer) waren je 3 cm breit und 20 cm lang, wovon 10 cm frei durch eine feuchte Kammer gespannt waren. Die mittlere der  $20 \times 10 \times 5$  cm großen Schalen enthielt Leitungswasser, die beiden äußeren je 500 ml  $1/75$  mol. Phosphat-

HCl-Puffer. Die in denselben Puffern 0,01%ig angesetzten Farbstoffe wurden in der Mitte der pufferfeuchten, zwischen Filterpapier kurz abgepreßten Streifen aufgetragen. Die Feldstärke betrug  $10-15$  V/cm (bei pH = 7, etwa 1,5 mA Stromstärke pro Streifen und 220 V Klemmenspannung) und die Laufzeit 1 Std.

Die Methode der Diffusion verschiedener Farbstoffe in 10%ige Gelatine war sinngemäß dieselbe, wie von Butterfaß (1956) beschrieben. Es kam aber infolge der ohnehin schlechten Vergleichbarkeit der Ergebnisse (verschiedene Fluoreszenzintensität und -farbe) nur auf offenkundige Unterschiede an; dementsprechend wurde das Verfahren vereinfacht.

Beim Vergleich zwischen sechs verschiedenen Pyrensulfonyl- (Oxyphenylsulfonyl-, Dioxypyrenylsulfonyl-, Aminophenylsulfonyl-, Acetylaminophenylsulfonyl-, Methylaminophenylsulfonyl-, [Butylsulfonyl]-aminophenylsulfonyl-, alle als Natriumsalze) diffundierte das ebenfalls streng anionische Acetylaminophenylsulfonyl als einziger Farbstoff deutlich schneller als das seit Strugger (1939) öfter benutzte Oxyphenylsulfonyl. Leider fluoresziert es viel schwächer und mit blauer Farbe, so daß nur mit UV-Licht angeregt werden kann.

Natriumfluorescein galt bisher als anionischer Farbstoff<sup>1</sup>. Seine Eigenschaften fallen aber ziemlich aus der Reihe heraus. Nachdem Förster (1951) einige Angaben über das Dissoziationsverhalten gemacht hat, war eine erneute Elektrophorese mit verbesserter Methodik zweckmäßig. Jeder Punkt der Abb. 2 (ausgezogene Kurve) ist ein Mittelwert aus zwei bis drei Versuchen, wobei der Abstand der Mitte des auf dem Papier wandernden Farbstoffstreifens von der Auftragstelle nach 1 Std. gemessen wurde. Die zahlreichen Punkte um  $\text{pH} = 3$ , die sich teilweise sogar genau decken, stammen von Natriumfluorescein Merck und Bayer und Kaliumfluorescein Bayer. Die Salze wandern also gleich. Mit steigendem  $\text{pH}$ -Wert nimmt die Wanderung stark zu. Bei gleichbleibender Molarität des Puffers wächst aber auch die Ionenstärke mit steigendem  $\text{pH}$ -Wert stark an, sobald sekundäres Phosphat in nennenswerter Menge in den Puffergemischen enthalten ist; wegen der höheren Leitfähigkeit steigt dann die Wanderungsgeschwindigkeit. Auch Oxyphenylsulfonyl (Abb. 2, gestrichelte Kurve) weist oberhalb von  $\text{pH} = 6$  einen deutlichen Anstieg auf, vor allem aus dem genannten Grund. Unterhalb von  $\text{pH} = 6$  erhält man für Oxyphenylsulfonyl eine gerade Linie bis mindestens gegen  $\text{pH} = 1-1,5$  (vgl. Förster 1950) und kann deshalb auch für Alkalifluorescein nur in diesem Gebiet Aufschlüsse aus Abb. 2 entnehmen.

Nach Förster (1951) überwiegt bei Fluorescein in alkalischer bis neutraler Lösung das zweiwertige Anion und in stark saurer Lösung das Kation. Dazwischen haben das einwertige Anion und das Neutrale Molekül „nur kleinere Existenzbereiche auf der  $\text{pH}$ -Skala“. Es ist offenkundig, daß mindestens das Neutrale Molekül noch in den physiologischen Bereich fällt. Wo nämlich die Kurve des Oxyphenylsulfonyls noch waagrecht verläuft, deutet die stark ansteigende Fluoresceinkurve auf ein Gleichgewicht hin zwischen mindestens einwertigen Anionen, Neutralmolekülen und Kationen.

Die Alkalifluoresceine dürfen also nicht mehr schlechtweg als anionische Farbstoffe bezeichnet werden. Sie sind umladbar und haben also einen IEP.

Scharf (1955) fand den IEP elektrophoretisch in freier Lösung bei  $\text{pH} = 3,5-5,8$ , was wohl richtiger ist als  $\text{pH} = 5$ ; für genaue IEP-Bestimmungen eignet sich die Papierelektrophorese nicht (Kölbel 1948). Je höher der IEP liegt,

<sup>1</sup> Die Ausdrücke „anionisch“ (statt „anodisch“) und „kationisch“ (statt „kathodisch“) werden hier eingeführt, weil sie unmittelbar den Farbstoff selbst bezeichnen und nicht den Pol, zu dem er wandert.



desto eher könnte auch das Kation noch im unteren Teil des physiologischen Bereichs existieren.

Dieses Ergebnis muß allen Diskussionen über die Anwendung des Alkalifluoresceins zugrunde gelegt werden, weil damit die intensive Plasmafärbung (Schumacher 1933, 1936, Döring 1935, Strugger 1938) zwanglos erklärbar wird. Strugger (1938) schrieb: „Je saurer die Farblösung ist, desto rascher adsorbiert der lebende Protoplast den Farbstoff.“ Das ist nun beinahe selbstverständlich geworden. Weitere Eigenschaften des Farbstoffs bleiben aber noch zu erklären.

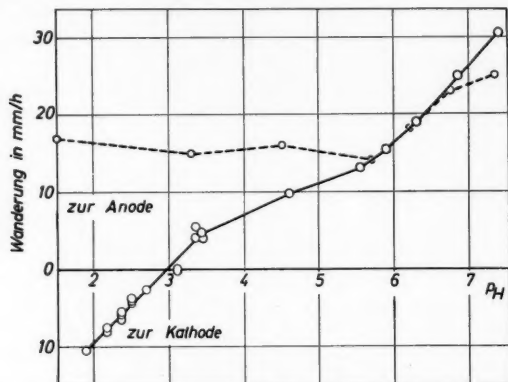


Abb. 2. Die papierelektrophoretische Wanderung von Natrium- und Kaliumfluorescein (ausgezogen) und Oxypyrentrisulfonat (gestrichelt).

Das Diffusionsvermögen des Natriumfluoresceins in Gelatine ist wesentlich höher als das von Oxypyrentrisulfonat (Bauer 1953).

Die Berberinsulfate Merck Nr. 1815, 1818 und 1817 sind kationische Farbstoffe verschiedener Reinheit. Für die Ziele der vorliegenden Arbeit reicht das Präparat Nr. 1815 aus. Die Diffusionsgeschwindigkeit in Gelatine ist, in Übereinstimmung mit Bauer (1953), wesentlich größer als die von Oxypyrentrisulfonat; allein deshalb wurde das Fluorochrom hier in die engere Auswahl gezogen. Kationische Farbstoffe eignen sich ja weniger als Anzeiger für einen Wasserstrom, und in Pflanzen breitet sich Berberinsulfat tatsächlich oft langsamer aus als Oxypyrentrisulfonat. Von aschefreier Gelatine scheint es kaum festgehalten zu werden.

Rhodamin B Bayer wandert in der vorliegenden Charge schwach anodisch. Die Diffusionsgeschwindigkeit in 10%iger Gelatine ist mindestens um 40% größer als die von Oxypyrentrisulfonat. Bekanntlich ist der Farbstoff lipidlöslich und wird von Gerbstoffen ausgefällt.

### Material und Methode

Pflanzen von *Vicia faba* L. und *Phaseolus coccineus* L. wurden im Gewächshaus herangezogen. Als die beiden Fiedern des vierten Blattes von *Vicia faba* etwa

50 mm lang waren, wurde dieses Blatt verwendet. Bei *Phaseolus coccineus* wurden sowohl Primär- als auch Folgeblätter untersucht; die Ergebnisse waren grundsätzlich gleich.

Die Blätter von *Vicia faba* sind nicht so derb wie die von *Phaseolus coccineus* und versprachen deshalb mehr Erfolg.

Die Blattoberseite von *Vicia faba* trägt mehr Keulenhaare als die Unterseite; bei *Phaseolus* ist es umgekehrt. Sie stehen bevorzugt auf den Rippen und am Blatt- rand. Das waagrecht liegende Köpfchen von *Vicia faba* (Abb. 3—5) zeigt zur Blatt- spitze, ist  $55\ \mu$  lang und  $40\ \mu$  breit, etwas dorsiventral abgeplattet und besteht aus einer Basiszelle, einer Stielzelle und vier Köpfchenzellen mit großen Gerbstoff- vakuolen. Die Riffelung der Kutikula am Grunde verläuft wie bei allen Haaren radial. Die Keulenhaare von *Phaseolus coccineus* sind kleiner und etwas anders gebaut (Abb. 12). Bei beiden Pflanzen ist die Außenwand der Stielzelle stark verdickt und vor allem an der Basis kutinisiert (Abb. 3).

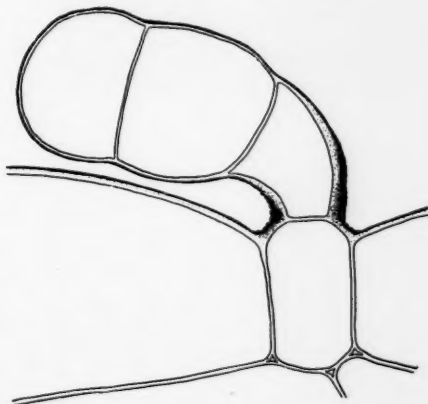


Abb. 3. Ein Keulenhaar von *Vicia faba*.

Das zu untersuchende Blatt wurde abgeschnitten und an der Basis mit „Viktoria“-Gummilösung abgedichtet. Diese hat sich bei kurz- fristigen Versuchen (1—2 Std. Dauer) besser bewährt als die herkömmliche Kakaobutter, weil sie viel sicherer abdichtet und schon nach wenigen Sekunden ein Untertauchen des Blatts erlaubt. Solange weit genug von der Abdichtungsstelle entfernt beobachtet wird, stört weder das flüchtige Lösungsmittel noch die Tatsache, daß sich der Gummi mit der Zeit zusammenzieht und das Gewebe einschnürt.

Die abgedichteten Blätter wurden in Petrischalen in die 0,1%ige Farbstofflösung getaucht, zur vollkommenen Benetzung mit einem Stück Filterpapier bedeckt und im Regelfall nach 1 Std. untersucht. Die Farbstofflösungen reicherten sich mit Sal- zen aus der Kutikula an, stiegen deshalb im pH-Wert und mußten nach wenigen Versuchen erneuert werden. Jeder Versuch wurde etwa zehnmal durchgeführt; die Streuung der Ergebnisse war sehr groß.

Nach der Entnahme wurde das Blatt in Leitungswasser abgespült, vorsichtig zwischen Filterpapier abgetrocknet und im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop unter- sucht. Dies geschah bei schwächeren Vergrößerungen in Luft, bei stärkeren in Paraffinöl.

Optik: Großes Fluoreszenzmikroskop für Auflicht von Zeiss mit der 10-A- Bogenlampe, Leica mit Mikas-Aufsatz, Filme 17/10<sup>9</sup> DIN, Belichtungszeit bei An- färbung mit Oxypyrentrisulfonat höchstens 2 Sek.

### Versuche an *Vicia faba* L. ohne Zusätze

Nach Eintauchen in 0,1%ige Lösung von Oxypyrentrisulfonat in dest. Wasser (Lösungs-pH = 5,6) waren die Zellwände der Keulenhaare

gefärbt (Abb. 4 und 5). Die Wand der Stielzelle fluoreszierte im oberen Teil sehr stark, die Basiszelle und die sie umgebenden Epidermiszellen dagegen in der Regel überhaupt nicht. Die Haare beider Blattseiten verhielten sich gleich. Als erste Stellen der Epidermis leuchteten die Keulenhaare schon



Abb. 4.



Abb. 5.

Abb. 4. Keulenhaare von *Vicia faba*. Blatt 1 Std. lang in 0,1%ige Lösung von Oxypyrentrisulfonat getaucht. Optische Ebene hochgestellt. 440 $\times$ .

Abb. 5. Wie Abb. 4, optische Ebene tiefer. 440 $\times$ .

nach 10–20 Min. auf. Weitere Orte der Farbstoffaufnahme traten auch nach 1 Std. noch dagegen zurück.

Auf der Blattunterseite konnte durch eine meist sehr kleine Zahl von Keulenhaaren Farbstoff in die Epidermisantiklinen eintreten. An diesen



Abb. 6.

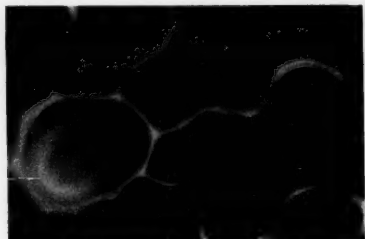


Abb. 7.

Abb. 6. Blattunterseite von *Vicia faba*. Blatt 1 Std. lang in 0,5%ige Lösung von Acetylaminopyrentrisulfonat getaucht. Der Farbstoff ist durch ein Keulenhaar in die Epidermisantiklinen eingedrungen. 70 $\times$ .

Abb. 7. Wie Abb. 6, weniger weit fortgeschritten. Acetylaminopyrentrisulfonat dringt durch die Basis eines Keulenhaars in die Epidermisantiklinen ein. 660 $\times$ .

schwach durchlässigen Haaren waren keine Schäden zu erkennen; sie leuchteten selbst schwächer als die undurchlässigen Trichome.

Wurde die Farbstoffkonzentration auf 0,5% erhöht, so war die Fluoreszenz der Keulenhaare zwar etwas stärker als in 0,1%iger Lösung; die Durchlässigkeit stieg dabei aber nicht an. Nach Anwelken bis zum eben

erkennbaren Turgeszenzverlust waren mehr Keulenhaare durchlässig als beim Tauchen vollturgeszenter Blätter.

Das besonders diffusible Acetylaminopyrentrisulfonat (0,5%ig in dest. Wasser, Lösungs-pH = 4,3) drang durch viele, manchmal durch fast alle Keulenhaare der Unterseite in die Epidermisantiklinen ein (Abb. 6 und 7). Das Plasma blieb ungefärbt. Die Stielzellen der oberseitigen Keulenhaare ließen den Farbstoff nicht durchtreten.

Natriumfluorescein (Merck Nr. 3992, 0,1%ig in dest. Wasser, Lösungs-pH = 7,6) färbte das Cytoplasma und die Kerne der Köpfchenzellen stark an. Auf der Blattunterseite trat der Farbstoff durch fast alle Keulenhaare in die Epidermisantiklinen ein, worauf sich sekundär das Plasma färbte. Die Plasma- und, wo noch vorhanden, die Zellwandfärbung verschwanden scheinbar vollkommen, wenn ein Blattstück auf einen Tropfen Paraffinöl gelegt wurde und sich dieses im Mesophyll ausbreitete. Die Epidermis blieb dabei unbenetzt. Es war also weder zwischen Objekt und Objektiv noch, da die Beobachtung im Auflicht erfolgte, zwischen Objekt und Lichtquelle Paraffinöl vorhanden;

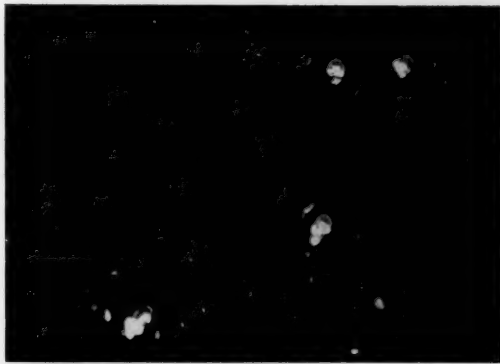


Abb. 8. Kristalle von Berberinrhodanid an den Keulenhaaren der Unterseite von *Vicia faba*, 70 $\times$ .

dennoch verschwand die Färbung. Ausschließlich in dem vorher gefärbten Bereich um die Keulenhaare herum fluoreszierten aber alle Chloroplasten der Schließzellen leuchtend gelb. Eine bestehende Färbung ist also mit Ausnahme der Chloroplasten auf optischem Weg gelöscht worden. Eine ähnliche Erscheinung findet man, wenn man den Farbstoff von der Basis her aufsteigen läßt, bis die ganze Epidermis fluoresziert. Sie leuchtet dann über den Interzellularen, vor allem über den Atemhöhlen der Oberseite, in so streng begrenzter Zone stärker als über den Mesophyllzellen, daß auch ohne Infiltration eine teilweise optische Löschung durch das rot fluoreszierende Mesophyll außer Zweifel steht. — Aus der Beobachtung gewinnt man den Eindruck, daß der Farbstoff aus dem Köpfchen streng auf dem Wandweg ins Blatt eindringt; Kerne und Plasma färben sich demnach sekundär. Vgl. aber Besprechung.

Der nach 1 Std. um praktisch alle Keulenhaare der Oberseite vorhandene Farbhof scheint wenigstens teilweise durch Reflexe der stark fluoreszierenden Keulenhaare verursacht zu sein. Bei dem grün fluoreszierenden

und allerdings auch weniger diffusiblen Oxypyrentrisulfonat war ein solches Bild nie zu beobachten.

Bei Verwendung von Berberinsulfat (Merck Nr. 1815, 0,1%ig in dest. Wasser, Lösungs-pH = 5,2) traten ähnliche Störungen auf. Es ist unsicher, ob der Farbstoff basal in die Epidermisantiklinen eindringen kann oder nicht.

Beim Aufstieg von 0,1 n KSCN mit nachfolgender Überdeckung durch eben noch flüssige 5%ige Gelatine mit Zusatz von 0,1% Berberinsulfat (Rouschal und Strugger 1940) bilden sich an den Keulenhaaren Kristalle von Berberinrhodanid (Abb. 8). Die Haare sind also auch Orte des bevorzugten Salzaustritts.

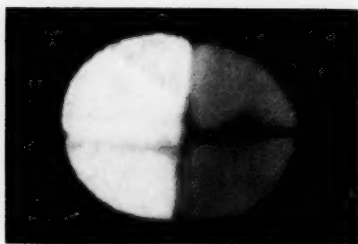


Abb. 9.



Abb. 10.

Abb. 9. Keulenhaar der Blattunterseite von *Vicia faba*. Blatt 30 Min. lang in 0,1%ige Lösung von Rhodamin B getaucht. Das Plasma der beiden distalen Zellen fluoresziert stärker. 660 $\times$ .

Abb. 10. Wie Abb. 9, Hellfeldaufnahme. Die Gerbstoffvakuolen der distalen Zellen haben das Rhodamin B besonders stark gespeichert. 600 $\times$ .

Einen ähnlichen Versuch hat Fentzke (1920) nach einem Vorschlag von Stahl angestellt, indem er mit Hilfe von Oxalatgelatine in mehrtägigem Versuch den möglichen Calciumaustritt aus den Keulenhaaren von *Vicia faba* nachwies.

Der trotz seiner schwach anodischen Wanderung praktisch elektro-neutrale, lipophile Farbstoff Rhodamin B (Bayer, 0,1%ige Lösung in Leitungswasser, Lösungs-pH = 6,5) ist diffusibler als Oxypyrentrisulfonat und wurde deshalb ebenfalls angewandt. Weil er sich mit Gerbstoffen verbindet, kann man mit starker Speicherung rechnen.

Rhodamin B färbte allein die Keulenhaare. Selbst die basale Verdickung der Stielzelle speicherte den Farbstoff nach 1 Std. immer noch nicht. Das Plasma der beiden distalen Köpfchenzellen leuchtete schon nach 1 Min., wobei meist die eine Zelle der anderen um eine Kleinigkeit voraus war (vgl. Weber 1932). Erst nach 5–10 Min. erfaßte die Färbung auch die beiden proximalen Köpfchenzellen, doch blieb deren Fluoreszenzintensität selbst nach 1 Std. noch deutlich geringer (Abb. 9).

Schon ohne sekundäre Färbung ist in den Keulenhaaren der extrafloralen Nektarien auf der Unterseite der Nebenblätter ein ähnlicher Unterschied zu erkennen: der Anthocyangehalt der proximalen Köpfchenzellen ist gewöhnlich größer. Vgl. Pekarek (1929).

Die Gerbstoffvakuolen waren nur im Hellfeld erkennbar gefärbt und zeigten den Unterschied zwischen proximalen und distalen Zellen sehr deutlich (Abb. 10). Obwohl das Plasma schon nach 1 Min. fluoreszierte, ließ es im Hellfeld auch nach 30 Min. noch kaum eine Anfärbung erkennen (Abb. 10).

### Versuche an *Vicia faba* mit Salzzusätzen

Bei Zusatz von 0,1 *n* oder 0,2 *n* KCl zu Oxypyrentrisulfonat waren 30–80% aller Keulenhaare durchlässig (Abb. 11). Es ist also eine erhebliche Steigerung eingetreten. Statt KCl können auch andere Salze verwendet werden; Sulfate sind ungeeignet. Ob die Wirkung zugefügter Ionen ähnlichen Gesetzmäßigkeiten folgt wie im Gelatineversuch (Butterfäß 1956), war nicht zu erkennen, weil die Beobachtungen zu schwer zahlenmäßig faßbar sind. Die durchlässigen Keulenhaare zeigten keine Schäden und vor allem keine Plasmafärbung. Keulenhaare der Blattoberseite konnten nur ausnahmsweise durch Salzzusatz wegsam gemacht werden.

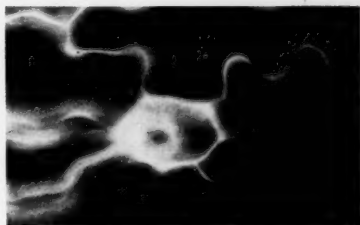


Abb. 11. Blattunterseite von *Vicia faba*. Blatt 1 Std. lang in 0,1%ige Lösung von Oxypyrentrisulfonat mit Zusatz von 0,2 *n* KCl getaucht. Die Stielzelle läßt den Farbstoff aus dem Köpfchen in die Epidermisantiklinen eindringen, 440X.

Acetylaminoxyrentrisulfonat mit 0,1 *n* KCl drang ebenfalls leichter ein als ohne diesen Zusatz. Die Durchlässigkeit war größer als bei Salzzusatz zu Oxypyrentrisulfonat.

In 1/150 mol. Phosphat-HCl-Puffern färbten sich die Keulenhaare zwischen pH=3 und pH=7–8 normal an. Bei tieferem pH-Wert traten Schäden ein; im alkalischen Bereich war nach 1 Std. nirgends auf den Blättern Sekundärfluoreszenz nachweisbar. Die Durchlässigkeit besaß um pH=5–6 ein Maximum, das nicht allein auf die Wasserstoffionen zurückgeführt werden kann; die pufferfreien Farbstofflösungen mit demselben pH-Wert drangen nämlich nicht oder nur ganz wenig ein. Die durchlässigen Keulenhaare leuchteten selbst weniger als die undurchlässigen, weil der Stau in den Haaren vermindert war.

### Versuche an *Phaseolus coccineus* L.

Am schnellsten färbten sich wieder die Keulenhaare an (Abb. 12), doch langsamer als bei *Vicia faba*. Ohne Salzzusatz war eine einwandfreie

Durchlässigkeit der Stielzelle wenigstens ausnahmsweise allein für Acetylaminopyrentrisulfonat zu beobachten; sie konnte durch Salzzusatz um eine Kleinigkeit gesteigert werden. Für



Abb. 12. Keulenhaare von der Unterseite von *Phaseolus coccineus*. Blatt 1 Std. lang in 0,1%ige Lösung von Oxyphyrentrisulfonat getaucht. 440 $\times$ .

Oxyphyrentrisulfonat bestand nur nach Salzzusatz Durchlässigkeit. Natriumfluorescein und Berberinsulfat ergaben keine klaren Ergebnisse.

In der Regel färbten Natriumfluorescein und Rhodamin B die beiden nebeneinander liegenden Köpfchenzellen sukzedan. Die morphologisch gleichen Zellen verhielten sich also ungleich (vgl. Weber 1932). Dann breitete sich die Färbung auf die beiden übrigen Köpfchenzellen aus, von denen aber die untere in 1 Std. nur wenig Farbstoff aufnahm.

Bei *Phaseolus* ist es nicht gelungen, die basale Durchlässigkeit durch Vorwelken zu steigern.

### Besprechung

Natriumfluorescein und Berberinsulfat eignen sich für das Problem viel weniger als Oxyphyrentrisulfonat. Die Störungen hängen wohl in erster Linie mit den Fluoreszenz- und Absorptionsspektren der Fluorochrome und des Chlorophylls zusammen. Eine Analyse der Störungen kann hier nicht unternommen werden. Immerhin scheint Natriumfluorescein als gegenüber dem Oxyphyrentrisulfonat höher diffusibler Farbstoff auf dem Wandweg durch die Keulenhaare von *Vicia faba* ins Blatt einzudringen. Die Wegsamkeit der Wand könnte man damit für bewiesen halten, wenn das Gegenargument, der Farbstoff sei durch das Plasma eingedrungen und die Plasmafärbung der Stielzelle nur gelöscht worden, zu entkräften wäre. Das ist aber kaum möglich. Versuche mit anderen Fluorochromen dagegen beweisen die Wegsamkeit des Basalrings mit größerer Sicherheit.

Wenn auch die Durchlässigkeit für Oxyphyrentrisulfonat bei *Phaseolus* nur in Ausnahmefällen nachweisbar war, so hat sich doch kein Anhaltspunkt für qualitativ andere Verhältnisse als bei *Vicia faba* finden lassen: die Kapillaren sind lediglich enger. Die Blätter von *Phaseolus* fühlen sich viel derber an, welken langsamer und lassen deshalb auch weniger Wasser eintreten.

Das Oxyphyrentrisulfonat als anionischer Farbstoff, der praktisch ganz in den Zellwänden bleibt, konnte bei einigen Keulenhaaren von *Vicia faba* eben noch ohne Zusatz durch die Wand der Stielzelle ins Blatt gelangen. (Das gilt für einstündige Versuche; längere Zeiten wurden absichtlich außer Betracht gelassen.) Verfünfachte Farbstoffkonzentration vergrößerte, wie erwartet, die Durchlässigkeit nicht wesentlich, weil die Porenweite den Eintritt beschränkte. Durchlässige Trichome waren weniger stark gefärbt, weil



sich der Farbstoff nicht so sehr staute; der Durchtritt durch die Kutikula erfolgt also auf dem Köpfchen, wo sie nur ganz dünn ist, und nicht an der Trichombasis.

Das Acetylaminopyrentrisulfonat lehrt gegenüber dem Oxypyrentrisulfonat, daß erhöhtes Diffusionsvermögen, das in der Art des Farbstoffs und nicht in seiner Konzentration begründet liegt, auch erhöhtes Eindringvermögen bedeutet, wenn die sonstigen Eigenschaften der Farbstoffe ähnlich sind.

Die kleinen Farbfleckradien von 0,1–0,5 mm könnten auch durch reine Diffusion erklärt werden und beweisen deshalb nur die Wegsamkeit, nicht das Vorliegen einer Massenströmung von Wasser.

Sehr merkwürdig ist, daß die Färbbarkeit der Keulenhaare schon knapp oberhalb des Neutralpunkts aufhört. Solange diese Erscheinung nicht zu erklären ist, wäre es vergeblich, für das Maximum der Durchlässigkeit um  $\text{pH} = 5-6$  eine Deutung zu suchen. Vergleiche mit den Arbeiten von Härtel (z. B. 1950) sind aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Es ist auch nicht sicher, ob die Modellversuche an Gelatine (Butterfaß 1956) für das vorliegende Problem mehr aussagen können als „Salze steigern die Durchlässigkeit für Farbstoff“.

Aus der bewiesenen Wasserwegsamkeit des basalen Rings der Keulenhaare folgt aber nicht unbedingt, daß der Wandweg für Wasser bevorzugt sein müsse. Wenn man nämlich die von Lepeschkin (1906) beobachtete starke Wassersekretion der Keulenhaare von *Phaseolus* in Betracht zieht (Sekretion des 400fachen Köpfchenvolumens durch ein Keulenhaar in 24 Std., wobei allerdings die von Nestler [1899 a, 1899 b] so sehr betonte starke Hygroskopizität des ausgeschiedenen Kaliumcarbonats nicht berücksichtigt wurde), so ist ein Hauptwasserweg durch das Plasma trotz guter Wegsamkeit der Wand immer noch diskutabel. Die Wasserausscheidung durch die Keulenhaare von *Phaseolus* wird heute kaum mehr bestritten, dagegen lehnte sie Borchert (1910) für *Vicia faba* ab, ausdrücklich im Gegensatz zu *Phaseolus*. Ob man wirklich ein verschiedenes Verhalten der beiden Pflanzen in Betracht ziehen muß, läßt sich weder aus der Literatur eindeutig erkennen noch mit der fluoroskopischen Methode überhaupt untersuchen. Bezüglich der Wasseraufnahme wurde in der vorliegenden Arbeit aber kein Anhaltspunkt für ein grundsätzlich verschiedenes Verhalten beider Pflanzen gefunden.

Muß man dann aber die Wassersekretion durch das Plasma der Köpfchen für beide Richtungen gelten lassen? Es ist schwer vorstellbar, daß ein polar gebautes Organ mit polar gebauten Zellen seine Funktion umkehrt. Die aktive Wasseraufnahme ist eine unbewiesene Vermutung Häberlandts und wäre in der Menge, wie sie Lepeschkin (1906) bei der Wasserabgabe beobachtete, völlig sinnlos und unmöglich. Krause (1935) lehnte die aktive Aufnahme von Wasser durch die Keulenhaare auf Grund leider wenig überzeugender Experimente ebenfalls ab.

Andererseits kann die Wand der Basiszelle Wasser nach innen leiten. Dieser Vorgang dürfte leicht umkehrbar sein, und es ist nicht ausgeschlos-

sen, daß auch die Wasserdrüsenzellen des Köpfchens, wenn es wirklich welche sind, ihr Wasser auf diesem Weg beziehen. Sehr wahrscheinlich geht die Wasseraufnahme und Weiterleitung nach innen allein in den Zellwänden vor sich. Stützen dieser Ansicht sind die bewiesene Wegsamkeit der Zellwände für Wasser auch in der Stielzelle, die geringe Wahrscheinlichkeit der funktionellen Umkehr eines polar gebauten Organs und die mindestens sehr zweifelhafte ökologische und physiologische Bedeutung einer etwaigen Umkehr. Treibende Kraft beim Einstrom von Wasser wäre das Wasserdefizit des Blatts, dessen Sog sich durch die Wand der Basiszelle zu den Außenwänden des Köpfchens als dem Ort des geringsten Filtrationswiderstands fortsetzt. Die anatomischen Gegebenheiten erleichtern diese Deutung. Die Kutinisierung erstreckt sich nämlich vor allem auf die äußeren Teile des basalen Rings und viel weniger auf seine weiter innen gelegenen Bezirke (Abb. 5). Es ist also nicht nötig, an einen Wasserstrom in einer stark inkrustierten Wand zu denken.

### Zusammenfassung

1. Durch den Basalring der Keulenhaare von *Vicia faba* drang das rein anionische Fluorochrom Oxypyrentrisulfonat im allgemeinen nicht ins Blatt ein, wohl aber das ebenfalls rein anionische und im Gelatineversuch schnell diffundierende Acetylaminopyrentrisulfonat.

2. Ein Zusatz von 0,1 n KCl zur Farbstofflösung steigerte die Durchlässigkeit, so daß jetzt auch Oxypyrentrisulfonat eindrang; die graduelle Verschiedenheit der beiden Farbstoffe blieb jedoch erhalten. Bei *Phaseolus coccineus* war nur ausnahmsweise Durchlässigkeit zu erzielen, vor allem bei Salzzusatz zu Acetylaminopyrentrisulfonat. Waren Puffersalze anwesend, so lag das Optimum der Durchlässigkeit bei pH = 5–6.

In Anbetracht der großen Farbstoffmoleküle wurde geschlossen, daß der Basalring unter natürlichen Bedingungen wenigstens für Wasser wegsam sein muß.

3. Die Keulenhaare beider Pflanzen sind bei der Wasseraufnahme lediglich Orte des geringsten Widerstands; aktive Wasseraufnahme wäre mit Funktionsumkehr eines polar gebauten Organs verbunden und ist sehr unwahrscheinlich. Die Aufnahme von Wasser dürfte über die Zellwände des Köpfchens durch die Wand der Stielzelle ins Blatt erfolgen.

4. Die Keulenhaare von *Vicia faba* färbten sich aus unbekannten Gründen nur unterhalb von pH = 7–8.

5. Rhodamin B wurde von den Gerbstoffvakuolen der beiden distalen Köpfchenzellen von *Vicia faba* viel stärker gespeichert als von denen der proximalen. Derselbe Unterschied bestand bei der Fluorochromierung des Plasmas. Auch die beiden distalen Köpfchenzellen von *Vicia faba* und *Phaseolus coccineus* unter sich färbten sich mit Rhodamin B oder Alkalifluorescein oft verschieden stark an.

6. Alkalifluorescein enthält im physiologischen Bereich außer Anionen auch Neutralkomplexe und wahrscheinlich sogar Kationen. Der Befund von Scharf (1955) über die Existenz eines IEP wurde bestätigt. Dadurch er-

klärt sich zwanglos die Speicherung des Alkalifluoresceins in pflanzlichen Zellen und ihre Abhängigkeit vom pH-Wert (Strugger 1938 a).

7. Alkalifluorescein und Berberinsulfat eignen sich auch auf Grund ihrer gelben Fluoreszenzfarbe nur schlecht für die Analyse der oberirdischen Wasseraufnahme durch die Keulenhaare. Natriumfluorescein dringt aber mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls primär durch die Wand der Stielzelle ins Blatt von *Vicia faba* ein.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strugger, danke ich herzlich für sein Interesse an der Arbeit.

Den Bayer-Werken in Leverkusen bin ich für die Überlassung der Pyrensulfonate sehr dankbar.

#### Literatur

- Bauer, L., 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. *Planta* 42, 367—451.
- Borchert, V., 1910: Beitrag zur Kenntnis der Wasserausscheidung der Leguminosen. Dissertation Berlin.
- Burgerstein, A., 1904, 1920, 1925: Die Transpiration der Pflanzen. Eine physiologische Monographie. 3 Bände. Jena. Zusammen etwa 600 S.
- Butterfaß, Th., 1956: Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserwegs in pflanzlichen Kapillaren. *Protoplasma* 47, 398—414.
- Fentzke, J., 1920: Zur Kenntnis der Verbreitung und zur Biologie der Wasserausscheidung. Dissertation Jena, 52 S. Masch.
- Förster, Th., 1950: Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle. *Z. Elektrochem.* 54, 42—46.
- 1951: Fluoreszenz organischer Verbindungen. Göttingen. 300 S.
- Haberlandt, G., 1894 a: Über Bau und Funktion der Hydathoden. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 12, 367—378.
- 1894 b: Anatomisch-physiologische Untersuchungen über das tropische Laubblatt. II. Über wassersecernierende und -absorbierende Organe. 1. Abhandlung. *Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl.* 103, I, 489—538.
- 1895: Desgl., 2. Abhandlung. *Ebenda* 104, I, 55—116.
- 1897: Zur Kenntnis der Hydathoden. *Jb. wiss. Bot.* 30, 511—528.
- 1924: Physiologische Pflanzenanatomie. 6. Aufl., Berlin. 671 S.
- Härtel, O., 1950: Wirkungen von Ionen auf die Wasserdurchlässigkeit des primären und sekundären Hautgewebes pflanzlicher Organe. *Protoplasma* 39, 364—385.
- Heyer, W., 1953: Über die Papierelektrophorese von Nucleinsäuren aus Zellen des Aszites-Tumors der Maus. Dissertation Münster. 43 S.
- Kölbel, H., 1948: Quantitative Untersuchungen über den Speicherungsmechanismus von Rhodamin B, Eosin und Neutralrot in Hefezellen. *Z. Naturforsch.* 3 b, 442—453.
- Krause, H., 1935: Beiträge zur Kenntnis der Wasseraufnahme durch oberirdische Pflanzenorgane. *Öst. bot. Z.* 84, 241—270.
- Lepeschkin, W. W., 1906: Zur Kenntnis des Mechanismus der aktiven Wasserausscheidung der Pflanzen. *Beih. Bot. Cbl.* I, 19, 409—452.
- 1923: Über aktive und passive Wasserdrüsen und Wasserspalten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 41, 298—300.

- Nestler, A., 1896: Untersuchungen über die Ausscheidung von Wassertropfen an den Blättern. S.ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. 105, I, 521—551.
- 1899 a: Die Sekrettropfen an den Laubblättern von *Phaseolus multiflorus* Willd. und der Malvaceen. Ber. dtsh. bot. Ges. 17, 333—337.
- 1899 b: Zur Kenntnis der Wasserausscheidung an den Blättern von *Phaseolus multiflorus* Willd. und *Boehmeria*. S.ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. 108, I, 690—710.
- Netolitzky, F., 1932: Die Pflanzenhaare. Handbuch d. Pflanzenanat., hsg. v. K. Linsbauer, Bd. IV. Berlin. 253 S.
- Pekarek, J., 1929: Vitalfärbung von Nektarien. Kolloidchem. Beih. 28, 353—366.
- Rouschal, E., und S. Strugger, 1940: Der fluoreszenzoptisch-histochemische Nachweis der kutikulären Sekretion und des Salzweges im Mesophyll. Ber. dtsh. bot. Ges. 58, 50—67.
- Scharf, J.-H., 1955: Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation myelotroper Nervenfasern nach Fluorochromierung in der Umgebung des IEP des Fluoresceins. Z. Naturforsch. 10 b, 355—356.
- Schumacher, W., 1935: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoresceins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. 77, 685—732.
- 1936: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoresceins in den Haaren von *Cucurbita Pepo*. Jb. wiss. Bot. 82, 507—535.
- Spanjer, O., 1898: Untersuchungen über die Wasserapparate der Gefäßpflanzen. Bot. Ztg. 56, 35—81.
- Strugger, S., 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 132, 255—304.
- 1939: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. 3. Untersuchungen an *Helxine Soleirolii* Req. Biol. Zbl. 59, 409—442.
- Weber, F., 1932: Protoplasmatische Ungleichheit morphologisch gleicher Zellen. Protoplasma 15, 291—295.
- Ziegenspeck, H., 1945: Fluoroskopische Versuche an Blättern über Leitung, Transpiration und Abscheidung von Wasser. Biol. generalis (Wien) 18, 254—326.
- 1952: Vorkommen und Bedeutung von Endodermen und Endodermoiden bei oberirdischen Organen der Phanerogamen im Lichte der Fluoroskopie. Mikroskopie 7, 202—208.

#### Anmerkungen bei der Korrektur:

Neuerdings haben Höfler, Ziegler und Luhan (1956: Protoplasma 46, 322—366) einen sehr anregenden Beitrag zur Fluorochromierung mit Natriumfluorescein geliefert. Zukünftige Untersuchungen an Hand der Ergebnisse sowohl von Höfler, Ziegler und Luhan als auch der vorliegenden Arbeit (Dissoziationsverhalten, Fluoreszenzlöschung) werden weitere Aufschlüsse liefern.

Obwohl Härtel (1956: Protoplasma 46, 301—316) denen der vorliegenden Arbeit verwandte Probleme behandelte, sind die Ergebnisse wegen der verschiedenen Fragestellung und Methode nicht gut vergleichbar. Beide Arbeiten ergänzen sich jedoch gut und enthalten keine unvereinbaren Befunde.

Anschrift des Verfassers: Dr. Theodor Butterfaß, Münster/Westf., Schloßgarten 3, Botanisches Institut der Universität.

## Beiträge zur Physiologie der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättern

Von

**Winfried Schleep**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster (Westfalen)

Mit 11 Textabbildungen

*(Eingegangen am 9. April 1956)*

Durch die Arbeit von Strugger (1950) ist das alte Problem der Kontinuität der Plastiden von neuem zur Diskussion gestellt und im Sinne Schimpers entschieden worden. Die Entwicklung der Chloroplasten ist gegenwärtig Gegenstand mehrerer Arbeiten im Botanischen Institut der Universität Münster (Böing 1953, Fasse-Franzisket 1955). Im Zusammenhang damit befaßt sich die eigene Arbeit mit der Bildung der Plastidenpigmente während der Entwicklung der Chloroplasten und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren. Die Untersuchungen werden an etiolierten Blättern durchgeführt, weil in diesen bei Belichtung die Entwicklung der Plastidenstrukturen in allen Blattregionen nahezu gleichzeitig vor sich geht und somit genügend Material für die quantitative Analyse zur Verfügung steht. Zur Pigmentsynthese in etiolierten Blättern bei Belichtung liegt schon eine Anzahl quantitativer Arbeiten vor. Hier sind die grundlegenden Untersuchungen von Seybold und Egle (1938) hervorzuheben. Besonders gut wurde die Pigmentbildung in Abhängigkeit von der Lichtqualität untersucht (vgl. Rudolf 1934, Simonis 1938, Strott 1938). Lubimenko und Hubbenet (1932) studierten den Einfluß der Temperatur auf die Farbstoffsynthese. Es wurde das Gesamtchlorophyll bestimmt, die Carotinoide blieben unberücksichtigt.

Die eigenen quantitativen Untersuchungen sollen folgende Punkte umfassen, die in der Literatur noch nicht genügend geklärt oder noch gar nicht in Angriff genommen worden sind:

1. Der Einfluß von Lichtintensität und Temperatur auf die Pigmentbildung unter besonderer Berücksichtigung der Carotinoide. Die Ergebnisse sollen zugleich die Einhaltung möglichst optimaler Bedingungen für die folgenden Versuche ermöglichen.

2. Die Synthese der Farbstoffe bei Einwirkung von Alkaliionen in abgestuften Konzentrationen auf die Zelle. Hierzu müssen die Salzlösungen

durch Infiltration an die Zellen der ergrünenden Gewebe herangebracht werden. Eine Zuführung der Salze durch die Wurzel erlaubt kaum noch Aussagen darüber, in welchem Maße der untersuchte Stoff wirklich bis in die Blattgewebe gelangt. Eine Anregung zu diesen Untersuchungen geht von Lärz (1942) aus, der bei seinen cytologischen Untersuchungen spezifische Einwirkungen von Rubidium und Caesium auf die Plastiden- und Grana-teilung festgestellt hat.

3. Soll das Assimilations- und Atmungsverhalten während des Ergrünungsprozesses in Abhängigkeit von der gebildeten Farbstoffmenge untersucht werden.

Bis heute liegen hier noch keine erschöpfenden und befriedigenden Mitteilungen in der Literatur vor. Die Ergebnisse der Arbeiten von Irving (1910) und von Blauw-Jansen, Komen und Thomas (1950) erscheinen auf Grund methodischer Mängel zweifelhaft. Willstätter und Stoll (1918) untersuchten nur das Assimilationsverhalten am Ende des Pigmentbildungsprozesses. Die Möglichkeit zur Benutzung eines Uras-Gerätes (Seybold 1942, Egle und Ernst 1949, Strugger und Baumeister 1951) gestattet heute eine erfolgreiche Bearbeitung dieses Fragenkomplexes.

### I. Methodisches

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Pigmentausbildung von physikalischen Faktoren und der Einwirkung von Alkalisalzen wurde Sommer-raps verwendet. Objekte für die Assimilationsversuche waren Sommergerste und Mais. Benutzt wurde nur Hochzuchtsaatgut folgender Sorten: Liho-Sommerraps, Isaria-Sommergerste und gelber Badischer Landmais<sup>1</sup>. Die Anzucht erfolgte in Blumentöpfen im Dunkelkeller. Die Temperatur im Dunkelraum schwankte während der gesamten Untersuchungen zwischen 17 und 20° C. Im Verlauf der einzelnen Versuchsreihen war sie praktisch konstant. Tägliches Gießen gewährleistete, daß die Pflanzen keiner Beschränkung der Wasserversorgung unterlagen. Die Luftfeuchtigkeit war infolge des starken Gießens immer sehr hoch.

Während der Versuche wurde das etiolierte Material in regulierbaren Thermostaten mit dem Licht einer wassergekühlten 500-W-Glühbirne (Philips) bestrahlt. Durch Annähern und Entfernen der Objekte von der Lichtquelle kann die Lichtintensität beliebig zwischen 2000 und 25.000 Lux gewählt werden. Geringere Lichtstärken werden durch Zwischenschalten von Milchglasscheiben ermöglicht. Die Temperatur der Thermostaten schwankt um  $\pm 0,5^\circ$  C des gewünschten Wertes.

Die chromatographische Trennung der Assimilationspigmente erfolgt in Anlehnung an die Methode von Wendel (1948, 1950) in der Kartoffelstärkesäule. Das durchlaufende Carotin wird auf Aluminiumoxyd aufgenommen. Um eine Zersetzung der Farbstoffkomponenten im Chromato-

<sup>1</sup> Für die Überlassung des Saatgutes möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Dr. Eifrig, Leiter der Samenprüfstelle in Münster i. W., meinen Dank aussprechen.



gramm zu verhindern, wird das Adsorptionsrohr mit einer Manschette abgedunkelt und nach Entwicklung des Chromatogramms mit Benzin-Benzol-Gemischen (das Verhältnis der beiden schwankt je nach Qualität der Kartoffelstärke) im wasserfreien  $\text{CO}_2$ -Strom getrocknet. Außer der Kartoffelstärke (des Lebensmittelhandels) werden nur Mercks Reagenzien p. a. verwendet. Der zur Elution verwendete Äther war peroxydfrei (Kathen 1950).

Die Ermittlung des Farbstoffgehaltes der ätherischen Pigmentlösungen erfolgte subjektiv photometrisch mit dem Leitz-Photometer Leifo K in Verbindung mit dem großen, besonders lichtstarken Leitz-Monochromator. Änderungen der Lichtintensität wurden durch einen Spannungskonstanthalter (Typ AKB 250 der Firma Klein, Schöngau am Lech) ausgeschaltet. Der Monochromator wurde durch Vergleich mit den Spektrallinien einer Hg-Höchstdruckdampflampe geeicht (W. U y t e r h o e v e n 1938). Zur Sicherstellung der Reinheit der chromatographisch gewonnenen Pigmentlösungen wurden ihre Absorptionskurven im Bereich des sichtbaren Lichtes bestimmt. Die Extinktionskurven stimmen mit den Kurven bei Rabinowitsch (1951) völlig überein. Damit ist bewiesen, daß die angewandte chromatographische Methode reine Farbfraktionen liefert und für die quantitative Plastidenpigmentanalyse gut geeignet ist. Die Einwände von Seybold (1950) gegen die Methode von Wendel sind nicht gerechtfertigt, zumal auch im Chromatogramm niemals Zonen von Zersetzungsprodukten auftraten.

Zur Messung wurden folgende Wellenlängen benutzt: Chlorophyll a 663 m $\mu$ , Chlorophyll b 645 m $\mu$ , Carotin 450 m $\mu$ , Xanthophyll 445 m $\mu$ . Da für die Eichung des Photometers keine reinen Präparate der Pigmente zur Verfügung standen — von verschiedenen Seiten zugesandte Chlorophyllpräparate erwiesen sich bei der chromatographischen Überprüfung als stark verunreinigt —, wurden die von Rabinowitsch (1951) für Chlorophyll a und b angegebenen mol. (dek.) Extinktionskoeffizienten von Scheile und Comar zur rechnerischen Ermittlung einer Eichskala herangezogen. Die entsprechenden Werte für Carotin und Xanthophyll stammen von Kumar Kar (1937).

Als Bezugsgröße diente bei den Versuchen mit Gerste und Mais die Blattfläche, bei denen mit Raps das Trockengewicht, da die Rapskeimblätter für eine Flächenbestimmung zu klein sind. Um die Meßgenauigkeit der Pigmentbestimmung durch die aufgezeigte Arbeitsmethode zu ermitteln, wurde der Farbstoffgehalt von Blattmaterial, das unter völlig gleichen Bedingungen aufgewachsen war, gleichzeitig dreimal bestimmt. Es ergaben sich folgende Mittelwerte (auf 100 mg Trockengewicht bezogen) und die zugehörigen wahrscheinlichen mittleren Fehler (vgl. Küster und Thiel 1947):

Chlorophyll a	0,206 $\pm$ 0,003 mg ( $\pm$ 1,5%),
Chlorophyll b	0,087 $\pm$ 0,0011 mg ( $\pm$ 1,3%),
Carotin	0,017 $\pm$ 0,0009 mg ( $\pm$ 5,3%),
Xanthophyll	0,030 $\pm$ 0,0002 mg ( $\pm$ 0,7%).



## II. Der Einfluß von Lichtintensität und der Temperatur auf die Ausbildung der Plastidenpigmente

Schon Sachs (1862) erkannte die Bedeutung der Lichtintensität für das Ergrünen von etiolierten Maisblättern. Er fand das Optimum bei schwachen Lichtstärken. Jedoch ist bis heute der Einfluß der Lichtintensität noch nicht — mit Ausnahme der Arbeit von Sjöberg (1931) — quantitativ untersucht worden. Sjöberg variierte die Belichtungsdauer und kombinierte sie mit der Belichtungsstärke so, daß die täglich eingestrahelte Energie bei allen Versuchen gleich war. Das Maximum der Pigmentbildung lag bei täglichen Belichtungszeiten von 9 bis 13 Stunden. Die Aufklärung der Abhängigkeit der Pigmentausbildung in belichteten etiolierten Blättern von der Lichtintensität erscheint besonders dringend, da in vielen Arbeiten über das Pigmentbildungsproblem bei unterschiedlichen Lichtintensitäten gearbeitet worden ist, so daß die Ergebnisse nicht vergleichbar sind. Oft wurde die Stärke des angewandten Lichtes nicht einmal festgestellt.

Sachs (1864) versuchte auch schon die Temperaturabhängigkeit der Pigmentsynthese in etiolierten Blättern aufzuklären. Es gelang ihm, das Temperaturminimum für einige Arten zu bestimmen. In neuerer Zeit führten Lubimenko und Hubbenet (1932) mit gleicher Fragestellung quantitative Untersuchungen durch. Sie bestimmten nur das Gesamtchlorophyll ohne Berücksichtigung der Carotinoide. Da die Bedeutung der Carotinoide für die Lebensfunktionen der Pflanze heute noch nicht eindeutig geklärt ist, erscheint es wünschenswert, das physiologische Verhalten der gelben Pigmente genau aufzuklären. Strott (1938) fand bei der normalen Anzucht von Roggen und Weizen bei 15 und 30° C nur geringe Unterschiede im Blattfarbstoffgehalt.

### a) Methodisches

Die Versuche wurden mit den abgetrennten Keimblättern von 6 Tage alten etiolierten Rapskeimlingen durchgeführt, um die Ergebnisse mit den Werten der Versuche über die Einwirkung der Alkaliionen im nächsten Abschnitt vergleichen zu können. Eingehende quantitative Vorversuche haben gezeigt, daß in abgeschnittenen Keimblättern die Pigmentbildung nur geringfügig gegenüber der in den Keimblättern an der unversehrten Pflanze verzögert ist. Die Cotyledonen werden mit der Pinzette abgenommen und in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale gebracht. In den geschlossenen Petrischalen werden sie nun den jeweils gewünschten Bedingungen im Belichtungsthermostaten ausgesetzt. Die in den Tabellen aufgeführten Werte sind der Mittelwert von drei Analysen und auf 100 mg Trockengewicht bezogen.

### b) Der Einfluß der Lichtintensität

Auf Grund der Ergebnisse von Lubimenko und Hubbenet, die 28° C als Optimum für die Chlorophyllbildung ermittelten, wurde diese Temperatur für die Versuchsreihe gewählt. Die Pigmentanalysen erfolgten nach 24 und 48 Stunden Belichtungszeit.

Nach 24 Stunden Belichtungszeit (Tab. 1, Abb. 1) ist bei allen Lichtintensitäten von 500 bis 25.000 Lux die gebildete Menge von Chlorophyll a (im

Tab. 1. Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenpigmente in etiolierten Rapskeimblättern von der Lichtintensität nach 24 Stunden Belichtungszeit.

Temperatur 28° C. Pigment in mg/100 mg Trockengewicht.

Lichtintensität in Lux	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$
500	0,248	0,105	0,018	0,038	2,36	2,11	6,30
1.000	0,250	0,104	0,019	0,035	2,40	1,84	6,56
3.000	0,266	0,115	0,023	0,042	2,31	1,83	5,86
5.000	0,237	0,103	0,022	0,037	2,30	1,68	5,76
10.000	0,248	0,106	0,021	0,038	2,34	1,81	6,00
15.000	0,264	0,119	0,027	0,052	2,22	1,93	4,97
20.000	0,258	0,116	0,032	0,063	2,22	1,97	3,94
25.000	0,252	0,109	0,025	0,059	2,31	2,36	4,30

folgenden a) gleich. Ebenso sind die Werte für das Chlorophyll b (im folgenden b) für alle Lichtintensitäten übereinstimmend, von geringen unregelmäßigen Schwankungen der Wert für a und b abgesehen. Ein Optimum

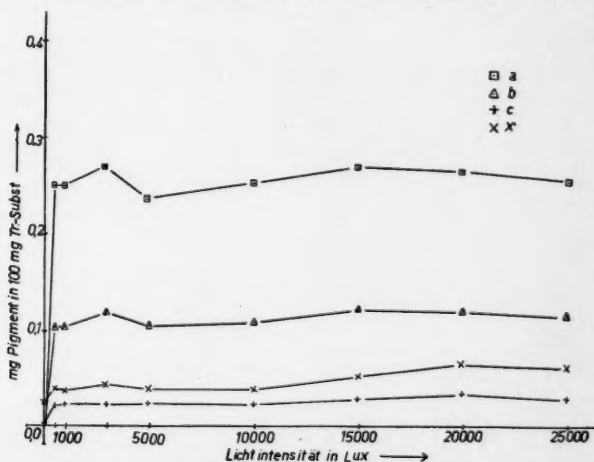


Abb. 1. Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenpigmente von der Lichtintensität in etiolierten Rapskeimblättern nach 24 Stunden Belichtungszeit. Temperatur 28° C.

kann nicht festgestellt werden. Das Verhältnis der grünen Pigmente  $\frac{a}{b}$  ist mit einem durchschnittlichen Wert von 2,3 konstant. Im Gegensatz zu den Chlorophyllen zeigen die Carotinoide mit zunehmender Lichtintensität eine verstärkte Ausbildung; aber auch bei ihnen ist der Wert bei 500 Lux schon

relativ hoch. Er bleibt dann sowohl beim Carotin (im folgenden c) und beim Xanthophyll (im folgenden x) bis 10.000 Lux konstant, um dann mit

Tab. 2. Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenpigmente in etiolierten Rapskeimblättern von der Lichtintensität nach 48 Stunden Belichtungszeit.

Temperatur 28° C. Pigment in mg/100 mg Trockengewicht.

Lichtintensität in Lux	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$
500	0,339	0,140	0,022	0,040	2,42	1,81	7,73
1.000	0,343	0,156	0,027	0,050	2,20	1,85	6,48
3.000	0,338	0,145	0,030	0,056	2,33	1,87	5,62
5.000	0,330	0,125	0,024	0,049	2,64	2,04	6,23
10.000	0,320	0,135	0,027	0,050	2,37	1,85	5,91
15.000	0,315	0,121	0,027	0,068	2,60	2,52	4,59
20.000	0,296	0,118	0,029	0,063	2,51	2,17	4,50
25.000	0,304	0,126	0,030	0,073	2,41	2,43	4,18

steigender Lichtintensität weiter zuzunehmen. Der relative Anstieg von c ist aber geringer als der von x. Das Verhältnis  $\frac{x}{c}$  verschiebt sich von

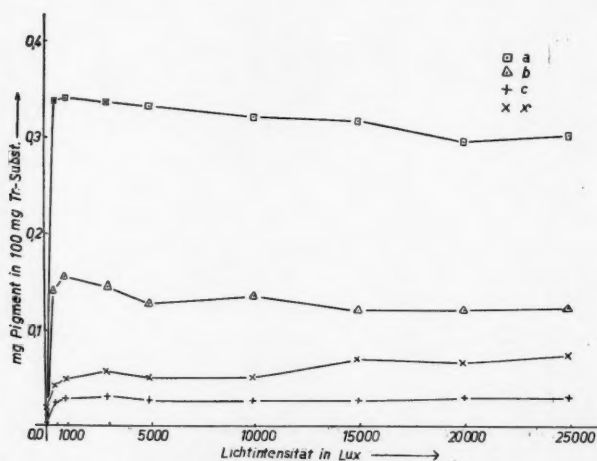


Abb. 2. Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenpigmente in etiolierten Rapskeimblättern von der Lichtintensität nach 48 Stunden Belichtungszeit. Temperatur 28° C.

10.000 Lux aufwärts langsam zugunsten von x (von 1,81 bis 2,36). Sehr deutlich ist die Zunahme der Carotinoide bei gleichbleibender Chlorophyllmenge in der Veränderung des Verhältnisses  $\frac{a+b}{c+x}$  mit steigender Licht-

intensität ausgedrückt (500 Lux: 6,3; 25.000 Lux: 4,3). Nach 48 Stunden Belichtungszeit (Tab. 2, Abb. 2) sind in der Ausbildung der einzelnen Pigmente bei den verschiedenen Lichtstärken deutliche Unterschiede vorhanden. Für die Chlorophylle ist ein Optimum bei etwa 1000 Lux festzustellen. Mit steigender Lichtintensität fallen die Kurven für die Chlorophylle langsam ab. Das Verhältnis  $\frac{a}{b}$  schwankt um 2,4. Die Carotinoide sind bei hohen Lichtintensitäten stark ausgebildet. Der Quotient der grünen und der gelben Pigmente  $\frac{a+b}{c+x}$  fällt von 8 bei 500 Lux auf 4 bei 25.000 Lux. Interessant ist die Ausbildung von Anthocyan bei den untersuchten Lichtintensitäten. Bei geringen Lichtstärken, etwa bis 10.000 Lux, war kaum eine Ausbildung des roten Farbstoffes festzustellen. Erst bei Lichtintensitäten über 10.000 Lux setzte die Anthocyanbildung ein, die besonders bei 20.000 und 25.000 Lux nach 48 Stunden sehr stark war. Eine erhebliche Anthocyanbildung bei starker Belichtung fanden auch Kuilman (1930) und andere Autoren.

c) Die Abhängigkeit der Plastidenfarbstoffausbildung von der Temperatur

Beim Studium der Temperaturabhängigkeit betrug die Lichtintensität 10.000 Lux, weil bei diesem Wert die Chlorophyllbildung gegenüber dem Optimum kaum vermindert ist, während die Ausbildung der Carotinoide ein mittleres Maß erreicht. Der Anthocyangehalt ist noch gering, so daß ein irgendwie gearteter Einfluß auf die Synthese der Plastidenpigmente nicht

Tab. 3. Die Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenfarbstoffe in etiolierten Rapskeimblättern von der Temperatur nach 24 Stunden Belichtungszeit.

Lichtintensität 10.000 Lux. Pigment in mg/100 mg Trockengewicht.

Temperatur in °C	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$
15	0,135	0,054	0,009	0,028	2,50	3,11	5,11
20	0,167	0,066	0,018	0,032	2,53	1,78	4,66
28	0,248	0,106	0,021	0,038	2,34	1,81	6,00
31	0,252	0,103	0,026	0,045	2,45	1,73	5,00
35	0,233	0,102	0,020	0,055	2,28	2,75	4,47
40	0,054	0,023	0,009	0,025	2,35	2,78	2,26

anzunehmen ist. Zum anderen ist schon festgestellt worden, daß das physiologische Verhalten anthocyanfreier und anthocyanführender Zellen derselben Art übereinstimmt (Engelmann 1887, Willstätter und Stoll 1918, Kuilman 1930). Es wurden Temperaturen von 15 bis 40°C angewandt. Die Tabellen 3 und 4 und die Abbildungen 3 und 4 lassen deutlich erkennen, daß das Optimum nach 24 und auch nach 48 Stunden Belichtungs-

zeit für a, b und c bei 28° C liegt. x zeigt ein abweichendes Verhalten, das Optimum liegt etwa bei 35° C. Das Verhältnis  $\frac{a}{b}$  ist bei allen Temperaturen

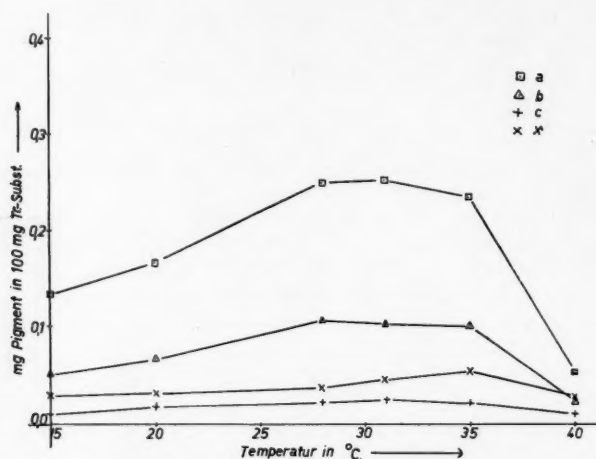


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenfarbstoffe in etiolierten Rapskeimblättern von der Temperatur nach 24 Stunden Belichtungszeit. Lichtintensität 10.000 Lux.

konstant, der Wert beträgt durchschnittlich 2,4 bis 2,5. Der Quotient der beiden Carotinoide  $\frac{x}{c}$  ist von den tiefen Temperaturen an bis zum Optimum gleich (1,7 bis 1,8). Der geringe Anteil von c an der gesamten Menge der

Tab. 4. Die Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenfarbstoffe in etiolierten Rapskeimblättern von der Temperatur nach 48 Stunden Belichtungszeit.

Lichtintensität 10.000 Lux. Pigment in mg/100 mg Trockengewicht.

Temperatur in °C	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$
15	0,212	0,082	0,020	0,035	2,59	1,75	5,35
20	0,290	0,125	0,027	0,046	2,23	1,70	5,69
28	0,320	0,135	0,030	0,050	2,37	1,67	5,91
31	0,278	0,110	0,027	0,054	2,53	2,00	4,79
35	0,259	0,101	0,027	0,070	2,56	2,59	3,71
40	0,071	0,030	0,012	0,034	2,37	2,83	2,20

gelben Pigmente bei 15° C nach 24 Stunden Belichtungszeit kann darauf zurückgeführt werden, daß zu Beginn der Belichtung schon eine relativ große Menge von x vorhanden ist, während c nur in Spuren auftritt. Bei

der geringen Bildungsgeschwindigkeit infolge der niedrigen Temperatur vermag c nicht so schnell das normale Verhältnis zu erreichen. Nach 48stündiger Belichtung ist jedoch das Verhältnis wieder normal. Oberhalb des Optimums verschiebt sich mit steigender Temperatur der Quotient  $\frac{x}{c}$  stark zugunsten von x. Bei 40° C ist der Wert für x fast dreimal so groß wie der

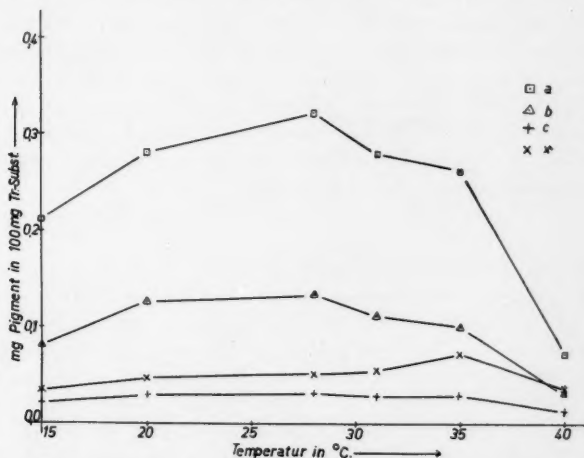


Abb. 4. Die Abhängigkeit der Ausbildung der Plastidenfarbstoffe in etiolierten Rapskeimblättern von der Temperatur nach 48 Stunden Belichtungszeit. Lichtintensität 10.000 Lux.

für c. Die stärkere Ausbildung der Carotinoide im Verhältnis zu den Chlorophyllen bei höheren Wärmegraden zeigt sich auch im starken Abfall des Quotienten  $\frac{a+b}{c+x}$  oberhalb des Optimums bei steigender Temperatur.

Bis 28° C ist die Chlorophyllmenge fünf- bis sechsmal so groß wie die der Carotinoide. Bei 40° C beträgt sie nur noch gut das Doppelte. In Übereinstimmung mit Kuilman (1930) wurde eine starke Anthocyanbildung bei niedrigen Temperaturen festgestellt, während sie bei hohen Temperaturen äußerst gering war.

#### d) Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich an Hand der heutigen Erkenntnisse über die Chlorophyllsynthese in der Pflanze deuten. Die einzelnen Stufen dieser Biosynthese sind noch weitgehend unbekannt, jedoch können folgende Zwischenstufen und Reaktionen als gesichert angesehen werden: 1. Bildung der Carotinoide in Dunkelreaktionen aus unbekannten Vorstufen. 2. Aufbau des Protochlorophylls in Dunkelreaktionen aus den Carotinoiden, wobei Zwischenstufen unbekannt sind (Rudolf 1934; vgl. auch Seybold und

Egle 1938 b). 3. Umwandlung des Protochlorophylls in Chlorophyll durch eine Photoreaktion (Seybold 1937, 1938, Noack und Kiessling 1929, 1931, Scharfnagel 1931, Smith 1948, Pirson 1949; vgl. auch Rabinowitsch 1945).

Die Lage des Optimums für die Ausbildung der Chlorophylle bei etwa 1000 Lux deutet darauf hin, daß die Geschwindigkeit der Photoreaktion, in der das Protochlorophyll in Chlorophyll umgewandelt wird, nur bei Lichtintensitäten unter 1000 Lux der begrenzende Faktor für die gesamte Reaktionskette der Chlorophyllsynthese ist. Bei größeren Lichtintensitäten als 1000 Lux ist die Geschwindigkeit der Dunkelreaktionen, die die Chlorophyllvorstufen bilden, maßgebend. Auch die Ausbildung der gelben Pigmente wird stark durch das Licht gefördert, das gilt zumindest für das Carotin; auch für diesen Prozeß ist aber nur eine geringe Lichtintensität erforderlich. Dagegen ist die beschleunigte Synthese der Carotinoide mit zunehmender Lichtintensität oberhalb der Chlorophylloptima nicht leicht zu deuten.

Die Beschleunigung der Bildung aller vier Pigmente mit steigender Temperatur bis zum Temperaturoptimum der Chlorophylle ist im Sinne der Van 't Hoff'schen Regel auf die Beschleunigung der Dunkelreaktionen, die die Vorstufen der Pigmente bilden, zurückzuführen, da die eigentliche Photoreaktion temperaturunabhängig ist. Auch hier ist wiederum die weitere Verstärkung der Ausbildung der Carotinoide, besonders des Xanthophylls, mit Überschreitung des Temperaturoptimums schwer verständlich. Durch die Annahme eines Verbrauchs der gelben Pigmente für den Aufbau der Chlorophylle läßt sich das abweichende Verhalten der gelben Farbstoffe, besonders des Xanthophylls, oberhalb der Chlorophylloptima von dem der Chlorophylle erklären. Immer wenn durch äußere Einflüsse eine Verminderung der Chlorophyllbildung erzwungen wird, steigt der Gehalt an Carotinoiden. Man kann daraus auf eine Hemmung einer Reaktion im Reaktionsgefüge der Chlorophyllbildung zwischen den Carotinoiden und dem Protochlorophyll schließen. Der Verbrauch der gelben Pigmente zum Aufbau der grünen ist verlangsamt, während die Synthese der Carotinoide unbehindert weiterläuft.

Lubimenko und Hubbenet (1932) sprechen die Vermutung aus, die starke Hemmung der Chlorophyllbildung bei hohen Temperaturen sei durch eine neuauftretende Reaktion bedingt, in der eine der Chlorophyllvorstufen in Verbindungen umgewandelt würde, die nicht mehr zur Chlorophyllsynthese geeignet sind.

Eine größere Wahrscheinlichkeit scheint aber die Hypothese zu haben, daß die Carotinoide infolge der extremen Außeneinflüsse für die Chlorophyllsynthese blockiert sind, da die Annahme eines Zusammenhanges zwischen den Chlorophyllen und Carotinoiden experimentell unterbaut ist.

Durch die starke Ausbildung der Carotinoide unter für die Chlorophyllsynthese ungünstigen Bedingungen ist auch in diesem Fall ein Schutz des Protoplasten gegen zu starke Lichteinstrahlung, der sonst vom Chlorophyll ausgeübt wird, im energiereichen blauen Bereich des Spektrums ge-



währleistet. Werden, wie z. B. bei niedrigen Temperaturen, alle vier Blattfarbstoffe nur schwach synthetisiert, so treten die jetzt reichlich gebildeten Anthocyane an ihre Stelle. Zugleich kann ein Schutz des nur in geringer Menge vorhandenen Chlorophylls vor dem Blaulicht durch die Carotinoide angenommen werden (Iwanowski 1914).

### III. Der Einfluß der Alkaliionen auf die Ausbildung der Plastidenpigmente in belichteten etiolierten Rapskeimblättern

In vielen Arbeiten ist der Einfluß von Ionen auf spezielle Strukturen, Zustände und die Reaktionsfähigkeit des Protoplasten analysiert worden (Hoerber 1926, 1948). Die hervorgerufenen Veränderungen gestatten oft Schlüsse im Hinblick auf Bau und Funktion des Protoplasmas und der Zellorganelle. Auch die für die vorliegende Arbeit besonders interessanten Zellorganelle, die Chloroplasten, sind schon auf Ioneneinflüsse hin untersucht worden. Lärz (1942) studierte die Einwirkung von Rubidium und Caesium auf die Plastiden von *Helodea canadensis*. Er konnte durch beide Alkaliionen eine Störung der Plastidenteilungen und eine Hemmung der Granavermehrung hervorrufen. Bauer (1943) fand in Moosen, die in 1/100 n RbCl-Lösungen kultiviert worden waren, Riesenplastiden. Während diese beiden Autoren durch Rb und Cs hervorgerufene starke Schädigungen der Zellen feststellten, fand Pirson (1939, vgl. auch Pirson und Keller 1952), daß das Rb bei einzelligen Algen sogar das K weitgehend ersetzen kann; das Cs-Ion ist dazu nicht in der Lage. Bei höheren Pflanzen konnten die Autoren eine Ersetzbarkeit des K durch Rb nicht feststellen (vgl. Baumeister 1952 a).

#### a) Methodisches

Zum Ergrünen wurden die abgetrennten Cotyledonen etiolierter Rapskeimlinge — wie im vorherigen Kapitel beschrieben — auf Filterpapier, das mit der jeweiligen Salzlösung getränkt ist, gebracht. Die methodisch größte Schwierigkeit liegt in der gleichmäßigen Versorgung aller Zellen des Blattes mit der untersuchten Salzlösung. Die Infiltration durch Zentrifugation (Weber 1927, Strugger 1949) erwies sich als unbrauchbar, da die Blättchen dann zuerst nur am Rande ergrüntem. Nach Infiltration im Vakuum (vgl. Strugger 1949, Keller und Gicklhorn 1928) erfolgt die Pigmentsynthese gleichmäßig in der gesamten Blattfläche. Es wurde immer nur kurzfristig mit den Salzlösungen infiltriert, so daß die Interzellularen des Blattes nicht vollständig mit Flüssigkeit gefüllt waren. Die durch die Ionenwirkung bedingten Hemmungen betrafen jedoch immer die Pigmentbildung der gesamten Blattfläche, soweit das visuell festgestellt werden kann. Es kann also eine gleichmäßige Wirkung auf alle Zellen des Blattes angenommen werden. Bei der angewandten kurzfristigen Infiltration trat bei Verwendung von Leitungswasser keine Verzögerung der Farbstoffsynthese gegenüber Kontrollen auf.

Alle Lösungen wurden mit Leitungswasser angesetzt, um die Schädigung

von Einsalzlösungen zu vermeiden (vgl. Hoeber 1926, Pirschle 1932). Zugleich war durch die Pufferwirkung des Leitungswassers ein konstanter pH-Wert (immer zwischen 7,3 bis 7,4) gewährleistet. Als Salze wurden benutzt: LiCl, NaCl, KCl, RbCl, CsCl, alle Merck p. a.; RbCl und CsCl mit einem Reinheitsgrad von 99,9% stammten zum Teil auch von der Firma Friedrich Wachendorf, Schleswig.

Die Pigmentanalyse erfolgt wiederum nach 24 und 48 Stunden Belichtungszeit. Jedoch werden aus Raummangel nur die Werte nach 48stündiger Belichtung angegeben; die naturgemäß niedrigeren Werte nach 24 Stunden Belichtungszeit stimmen in ihren Gesetzmäßigkeiten völlig mit ihnen überein.

#### b) Die Versuchsergebnisse

Die gewonnenen Werte sind in den Tabellen 5 bis 10 niedergelegt. Tab. 5 zeigt die Pigmentwerte der Kontrolle mit Leitungswasser.

Tab. 5. *Anstieg des Pigmentgehaltes in belichteten etiolierten Rapskeimblättern während einer Belichtungszeit von 48 Stunden.*

Zeit in Stunden	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$
0	—	—	0,002	0,012	—	6,00	—
24	0,248	0,106	0,021	0,038	2,34	1,81	6,00
48	0,320	0,135	0,027	0,050	2,37	1,85	5,91

Bei allen fünf Elementen nimmt die gebildete Pigmentmenge mit zunehmender Konzentration der Salzlösungen ab. Jedoch ist die Hemmwirkung der einzelnen Elemente nicht gleich stark. Während Na und K die Pigmentsynthese in einer Konzentration von 0,3 *n* völlig hemmen, haben Rb und Cs die gleiche physiologische Wirkung in einer Konzentration von 0,15 *n*. Li bewirkt die völlige Unterdrückung der Farbstoffausbildung schon in einer Konzentration von 0,10 *n*. Bei Salzlösungen dieser Konzentrationen sterben die Blättchen innerhalb von 24—48 Stunden ab.

Die Abnahme der Gehalte der Blätter an den einzelnen Pigmenten ist für die vier Farbstoffe nicht gleichmäßig. Das drückt sich deutlich im Abfall des Quotienten  $\frac{a+b}{c+x}$  mit steigender Konzentration aus. Es wäre aber verfehlt, hieraus auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Synthese der einzelnen Blattfarbstoffe zu schließen, da immer eine Verminderung, niemals eine Steigerung der Ausbildung der vier Pigmente oder eines von ihnen im Vergleich mit der Pigmentbildung bei der Kontrolle vorliegt. Die Pigmente verhalten sich völlig anders als bei den Versuchen zur Einwirkung von Lichtintensität und Temperatur. Durch hohe Lichtintensität und Temperaturen werden die grünen und gelben Pigmente gegensinnig beeinflusst. Während die gelben Pigmente dadurch eine Zunahme erfahren, wird gleichzeitig die Ausbildung der Chlorophylle vermindert. Durch die Einwirkung

der Salzlösungen wird die Geschwindigkeit der Synthese aller vier Blattfarbstoffe immer nur verringert. Die Veränderung des Verhältnisses der grünen zu den gelben Pigmenten läßt sich durch den schon zu Versuchsbeginn vorhandenen Gehalt an Carotinoiden, der schon im Dunkeln gebildet worden ist, erklären. Zieht man von der vorhandenen Menge  $c + x$

Tab. 6—10. *Einwirkung der Alkalichloridlösungen abgestufter Konzentrationen auf die Blattpigmentbildung in etiolierten Rapskeimblättern nach 48 Stunden Belichtungszeit.*

Pigment in mg/100 mg Trockengewicht.

Nr. der Tabelle	Konzentration in n	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$
6	0,01	0,204	0,095	0,026	0,036	2,15	1,38	4,82
	0,05	0,119	0,052	0,015	0,028	2,29	1,87	3,98
	0,10							
					sterben ab			
7	0,01	0,315	0,120	0,027	0,045	2,63	1,67	6,04
	0,05	0,296	0,109	0,028	0,041	2,62	1,46	5,72
	0,10	0,233	0,103	0,026	0,039	2,26	1,50	5,17
	0,15	0,151	0,055	0,017	0,030	2,75	1,76	4,38
	0,20	0,101	0,046	0,010	0,025	2,20	2,50	4,20
	0,30				sterben ab			
8	0,01	0,298	0,103	0,027	0,045	2,89	1,67	5,57
	0,05	0,290	0,097	0,031	0,043	2,99	1,39	5,23
	0,10	0,229	0,092	0,026	0,037	2,49	1,42	5,10
	0,15	0,154	0,054	0,017	0,031	2,85	1,82	4,33
	0,20	0,104	0,045	0,010	0,025	2,31	3,00	4,26
	0,30				sterben ab			
9	0,01	0,281	0,117	0,028	0,043	2,40	1,54	5,61
	0,05	0,125	0,055	0,016	0,029	2,27	1,81	4,00
	0,10	0,068	0,031	0,012	0,026	2,19	2,17	2,61
	0,15				sterben ab			
10	0,01	0,318	0,132	0,027	0,041	2,41	1,52	6,62
	0,05	0,180	0,071	0,020	0,030	2,54	1,50	5,02
	0,10	0,119	0,049	0,012	0,025	2,43	2,08	4,54
	0,15				sterben ab			

den während der Dunkelkultur gebildeten Anteil ab und berechnet man mit diesen Werten den Quotienten  $\frac{a+b}{c+x}$ , so erhält man für alle Konzentrationen Werte, die um 7 schwanken. Das beweist, daß bei den vorliegenden Versuchen die Synthese aller vier Blattpigmente im gleichen Maße beeinflusst wird.

Ebenso ist die Veränderung des Verhältnisses  $\frac{x}{c}$ , das sich mit steigender

Konzentration zugunsten vom x verschiebt, nur auf die im Dunkeln gebildete, im Verhältnis zu c größere Menge zurückzuführen.

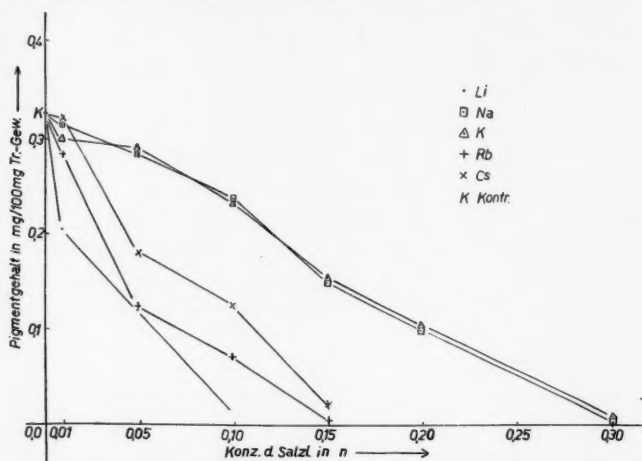


Abb. 5. Vergleich der Einwirkung der Alkalichloridlösungen in abgestuften Konzentrationen auf die Ausbildung von Chlorophyll a in etiolierten Rapskeimblättern. Belichtungszeit 48 Stunden.

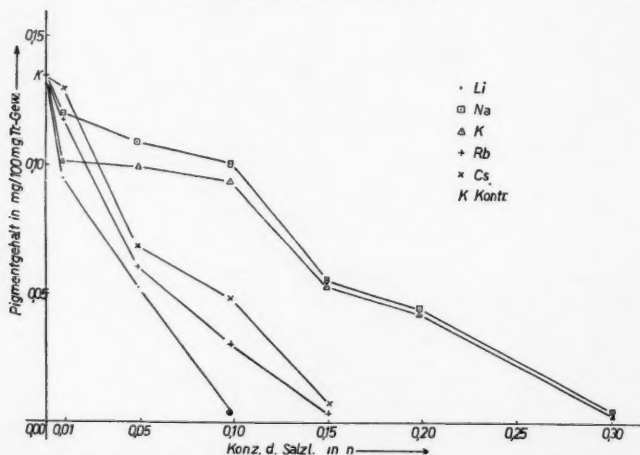


Abb. 6. Vergleich der Einwirkung der Alkalichloridlösungen in abgestuften Konzentrationen auf die Ausbildung von Chlorophyll b in etiolierten Rapskeimblättern. Belichtungszeit 48 Stunden.

Das Verhältnis der Chlorophylle  $\frac{a}{b}$  ist im allgemeinen für sämtliche angewandten Salzlösungen und für alle untersuchten Pigmente gleich, von

geringen unregelmäßigen Schwankungen abgesehen. Der Wert schwankt zwischen 2,2 und 2,4. Lediglich für Na und K ist festzustellen, daß dort

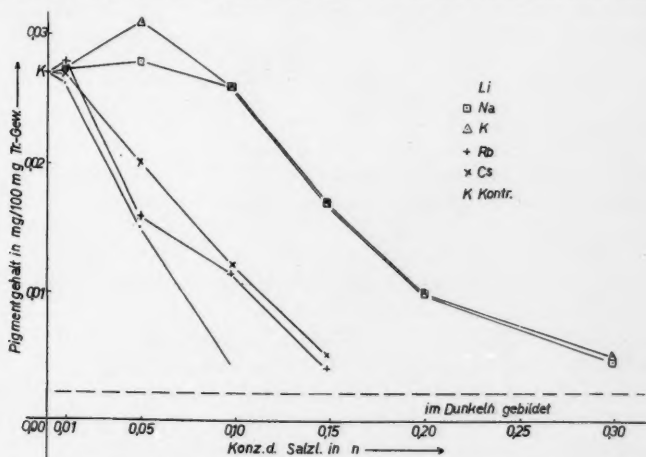


Abb. 7. Vergleich der Einwirkung der Alkalichloridlösungen in abgestuften Konzentrationen auf die Ausbildung von Carotin in etiolierten Rapskeimblättern. Belichtungszeit 48 Stunden.

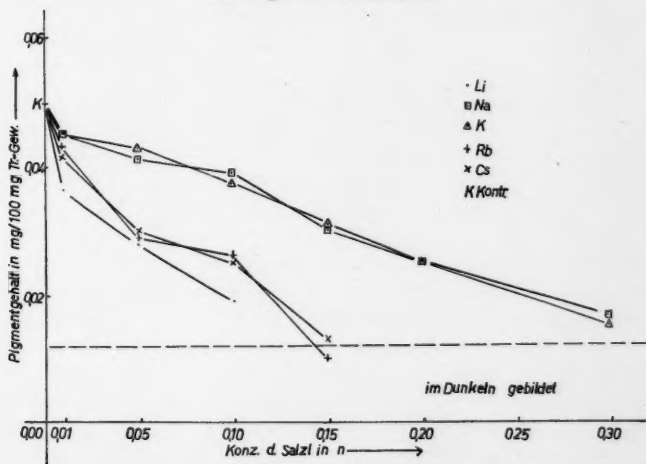


Abb. 8. Vergleich der Einwirkung der Alkalichloridlösungen in abgestuften Konzentrationen auf die Ausbildung von Xanthophyll in etiolierten Rapskeimblättern. Belichtungszeit 48 Stunden.

$\frac{a}{b}$  nach 48 Stunden Belichtungszeit einen relativ hohen Wert erreicht (für Na etwa 2,6 für K sogar 2,8 bis 2,9). Man kann daraus schließen, daß durch die

Ionen dieser beiden Elemente eine leichte Förderung der Bildung von a gegenüber b bewirkt wird. Diese Bevorzugung von a ist aber so gering, daß sie erst nach längerer Belichtungszeit mit den heutigen Bestimmungsmethoden festzustellen ist.

Bei Na, K und Cs ist ein schwacher Abfall des Quotienten  $\frac{a}{b}$  mit steigender Konzentration der einwirkenden Salzlösungen festzustellen. Das deutet auf eine größere Empfindlichkeit von a als von b gegenüber Ioneinflüssen hin. Diese Befunde decken sich mit der Feststellung von Eggle (1944), der unter verschiedenen, für die Pflanze ungünstigen Umständen (UV-Licht, Verdunkelung, Trocknung usw.) eine schnellere Zerstörung des Chlorophylls a als des Chlorophylls b fand.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe gestatten neben einer Betrachtung des Einflusses der Konzentration der Salzlösungen auch einen Vergleich der physiologischen Wirksamkeit der fünf Alkalikationen. Die Abbildungen 5—8 stellen die Einwirkungen der Chloridlösungen der Alkalimetalle in den untersuchten Konzentrationen auf die Ausbildung jedes einzelnen Blattpigments nach 48 Stunden Belichtungszeit dar.

In allen Diagrammen ist die Verminderung der gebildeten Pigmentmenge pro Zeiteinheit mit steigender Konzentration der Salzlösungen deutlich zu erkennen. Es ergibt sich für Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotin sehr deutlich, für Xanthophyll weniger scharf folgende Ionenreihe (nach zunehmender Stärke der Giftwirkung angeordnet): Na, K < Cs < Rb < Li.

### c) Diskussion

Aus den Ergebnissen der Versuche geht klar hervor, daß die Alkaliionen die Ausbildung der vier Plastidenpigmente immer gleichmäßig beeinflussen, so daß das mengenmäßige Verhältnis der einzelnen Farbstoffe zueinander immer gleich bleibt. Eine spezifische Wirkung der Ionen auf den Pigmentbildungsprozeß läßt sich nicht feststellen. Die Ursache dürfte vielmehr eine allgemeine, den biologischen Zustand des gesamten Protoplasten bzw. der Chloroplasten betreffende Einwirkung sein. Durch die Ionen wird also die Ausbildung der Blattpigmente in anderer Weise beeinflusst, als wie es unter extremen physikalischen Bedingungen der Fall ist (vgl. Abschnitt 2).

Es handelt sich um eine allgemeine Giftwirkung, deren Stärke neben der spezifischen Wirkung des betreffenden Ions stark von der Konzentration der Salzlösung abhängt. Durch die Ionen wird immer eine Verzögerung, niemals eine Beschleunigung der Pigmentbildung hervorgerufen. Eine Abtötung der Blattzellen allein auf Grund der durch den Atombau bedingten Ionenwirkung liegt aber nur bei Li, Rb und Cs vor, die schon in Konzentrationen von 0,1 n bzw. 0,15 n die Blättchen abtöten. Na und K haben dieselbe Wirkung erst in einer Konzentration von über 0,3 n. Diese Konzentration ist aber für die Zellen der Blättchen hypertonisch; orientierende Versuche mit Saccharoselösungen in abgestuften Konzentrationen (vgl. Strugger 1949) ergaben einen osmotischen Wert von 0,4 mol. Die angewandten höchsten Konzentrationen von NaCl und KCl haben etwa den

zweifachen osmotischen Wert. Die Zellen werden also plasmolysiert. Auch Führlinger (1938) fand eine Verhinderung der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättchen durch Plasmolyse der Blattzellen. Eine Deutung der spezifischen Ionenwirkung, wie sie bei Na und K in niedrigen Konzentrationen und bei allen angewandten Konzentrationen von Li, Rb und Cs vorliegt, ist äußerst schwierig; obwohl schon in zahlreichen Untersuchungen der Einfluß der Alkaliionen auf Kolloidsysteme und auch auf die lebende tierische und pflanzliche Zelle und deren physiologische Abläufe und Strukturen untersucht worden ist (vgl. Hoebner 1926, 1948; Pirsichle 1930, 1932, 1935 u. a.). Bei der Einwirkung auf Kolloidsysteme wurden Wirkungsreihen der fünf ionisierten Alkalimetalle gefunden, in denen die Reihenfolge der Elemente stark wechselte. Bei der Ausflockung von Hühnereiweiß *in vitro* traten unter bestimmten Bedingungen die nach den atomphysikalischen Eigenschaften der Elemente zu erwartenden Reihen  $\text{Li} < \text{Na} < \text{K} < \text{Rb} < \text{Cs}$  oder  $\text{Cs} < \text{Rb} < \text{K} < \text{Na} < \text{Li}$  auf. Bei geringfügigen Änderungen des physikochemischen Zustandes der Lösungen wechselte jedoch die Stellung der Elemente in den Reihen stark. Hoebner (1926) trägt dieser Tatsache durch die Einführung des Begriffs der Übergangsreihen Rechnung.

Noch weit unübersichtlicher ist die Einwirkung der Alkaliionen auf den lebenden Protoplasten der Zellen. Die Ionen bewirken eine Quellung bzw. eine Verflüssigung des Protoplasmas. Höfler (1940) und Kaiserlehner (1940) konnten diesen Effekt für das K-Ion bei ihren Kappenplasmolyseversuchen eindeutig nachweisen, zudem stellten sie fest, daß die Quellung des Plasmas schon durch geringe Mengen antagonistisch wirkender Ca-Ionen aufgehoben wird, sofern nicht schon irreversible Schädigungen des Protoplasmas durch zu starke Salzeinwirkung entstanden sind.

Nach der Hofmeisterschen Lyotropen-Ionenreihe besitzen die einzelnen Kationen ein unterschiedliches Vermögen, das Protoplasma in seinem Quellungszustand zu verändern. Fitting (1915) fand bei Versuchen an Epidermiszellen von *Rhoeo discolor* für Li eine bedeutend größere

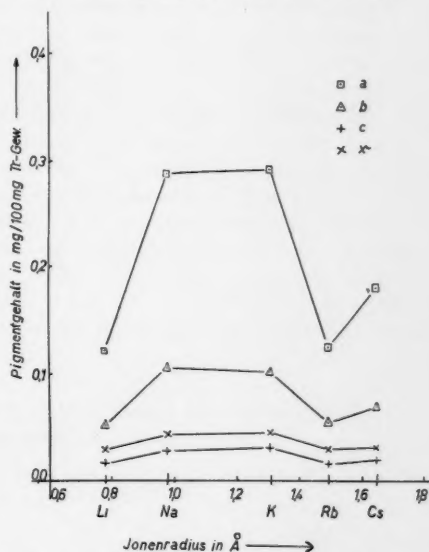


Abb. 9. Vergleich der Einwirkung von Chloridlösungen gleicher Konzentration der fünf Alkalimetalle auf die Ausbildung der vier Plastidenfarbstoffe in etiolierten Rapskeimblättern nach 48 Stunden Belichtungszeit. Konzentration der Lösungen 0,05 n.



Permeationsgeschwindigkeit als für Na und K, die sich etwa gleich verhielten. Die eingedrungenen Ionen riefen zugleich Veränderungen der Permeabilität der Plasmagrenzschichten hervor. Auch bei Einwirkung der Ionen auf die lebende Zelle wechselt die Stellung der Elemente in den Wirkungsreihen je nach dem untersuchten Prozeß und den jeweiligen physiologischen Gegebenheiten sehr stark.

Pirschle (1930, 1932) fand bei seinen Wachstumsversuchen mit verschiedenen Kulturpflanzen, daß die Reihenfolge der Elemente bei höheren Konzentrationen der Salzlösungen eine andere ist als bei stärkeren Verdünnungen. Es ist wohl anzunehmen, daß dieser Effekt bei den eigenen Versuchen durch die antagonistische Wirkung des Calciums des Leitungswassers aufgehoben wird.

Bei der Untersuchung der Ionenwirkung auf die Ausbildung der Plastidenpigmente ist die Lokalisation des beobachteten physiologischen Prozesses bekannt. Wieweit es sich jedoch bei der Einwirkung von Ionen auf die Bildung der Plastidenfarbstoffe um eine spezielle Beeinflussung der Plastiden handelt oder ob es sich um eine allgemeine Veränderung des Protoplasten handelt, kann nur die cytologische Analyse entscheiden. Die schon vorliegenden Befunde von Lärz (1942) und Bauer (1943), daß Rb' und Cs eine Hemmung der Plastiden- und Granateilung bewirken, deuten darauf hin, daß hier der Ansatzpunkt der speziellen Ionenwirkung zu suchen ist.

#### **IV. Pigmentbildung, Assimilationsleistung und Atmung belichteter etiolierter Gramineen-Primärblätter**

Zur Charakterisierung des Entwicklungszustandes der Plastiden zu bestimmten Zeitpunkten während des Ergrünungsprozesses in belichteten etiolierten Blättern ist neben den cytologischen Befunden und dem Pigmentgehalt die assimilatorische Leistung von größtem Interesse. Erst die Kenntnis des Assimilationsvermögens erlaubt eine Aussage über den jeweils erreichten physiologischen Zustand des photosynthetischen Apparates. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Chlorophyllgehalt keineswegs immer ein Maßstab für die Assimilationsleistung eines Blattes ist (Willstätter und Stoll 1918, van Hille 1938, Gabrielsen 1948, Baumeister 1952 b u. a.). Neben dem Gehalt an Assimilationspigmenten können noch verschiedene andere innere Faktoren bei gleichen Außenbedingungen eine unterschiedliche Assimilationsleistung bedingen (Drautz 1935, Harder 1930, 1933 u. a.).

Es sollte daher versucht werden, den Gehalt an Blattpigmenten und gleichzeitig die Assimilationsleistung in kurzen Abständen in belichteten etiolierten Blättern von Belichtungsbeginn an bis zum Abschluß der Pigmentbildung zu bestimmen. Zugleich sollte auch die Größe der Atmung gemessen werden. Der Atmungswert ist einmal zur Berechnung der wirklichen Assimilation erforderlich, zum anderen kann auch das Atmungsverhalten zur Charakterisierung der physiologischen Abläufe während der Blattfarbstoffausbildung beitragen.

## a) Methodisches

Als Versuchspflanzen dienten Sommergerste und Mais. Um einheitliches Versuchsmaterial zu erhalten, wurden für alle Versuche nur die Primärblätter verwendet, die in der Dunkelkultur bei der Gerste nach 8, beim Mais nach 15 Tagen voll entfaltet und somit für die Untersuchungen geeignet waren. Assimilationsleistung und Atmung wurden durch Messung der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme bzw. -Abgabe der abgeschnittenen Blätter mittels des Ultra-rotabsorptionsschreibers bestimmt (Strugger und Baumeister 1951, Baumeister 1952 b). Die Ergrünung erfolgte in den Thermostaten bei  $28^\circ\text{C}$  und 5000 Lux. Während der Assimilationsmessungen befanden sich die Primärblätter in der Kammer des Uras bei  $25\text{--}28^\circ\text{C}$  und beiderseitiger Belichtung von je 20.000 Lux. Die Atmungsintensität wurde im Dunkeln bei  $22\text{--}25^\circ\text{C}$  gemessen. Es ist nicht möglich, den Ergrünungsprozeß mit der gleichen Lichtintensität wie bei den Assimilationsversuchen (zweimal 20.000 Lux) zu bewirken, da bei den verwendeten Getreidearten der Pigmentbildungsprozeß durch hohe Lichtintensitäten noch bedeutend stärker gehemmt ist als in den etiolierten Rapskeimblättern. Während der Versuche wurde der Spaltöffnungszustand der Blätter nach der mikroskopischen Methode von Stålfelt (1939) kontrolliert. Vor der Belichtung sind die Spaltöffnungen vollständig geschlossen. Auch nach fünfstündiger Belichtung mit 5000 Lux sind nur wenige ganz schwach geöffnet. In diesem Zustand wird auch bei längerer Bestrahlung der Primärblätter mit zweimal 20.000 Lux (bis 1 Stunde) keine Vergrößerung der Spaltöffnungsweite erzielt. Nach zehnstündiger Belichtung mit 5000 Lux haben sich rund 50% der Stomate etwa ein Drittel geöffnet. Jetzt wird durch nachfolgende starke Belichtung eine weitere geringe Vergrößerung der Spaltweite bewirkt. Durch eine 15stündige Bestrahlung mit Schwachlicht werden 60–70% der Stomata der Gersteblätter über die Hälfte geöffnet. Nach 15–20 Minuten Belichtung mit zweimal 20.000 Lux sind dann 60–80% weit geöffnet. Beim Mais wird der volle Öffnungszustand erst nach 20stündiger Vorbelichtung und nachfolgender starker Belichtung möglich. Hier betrug der Anteil der weitgeöffneten Spalten etwa 50%. Baumeister (1952 b) hält diesen Prozentsatz an vollgeöffneten Stomata für ausreichend für eine optimale Assimilation, da er auch an Pflanzen im Freien keine höheren Prozentsätze für die vollgeöffneten Spaltöffnungen fand.

## b) Die Versuchsergebnisse

Die Gerste und der Mais (Tab. 11 und 12, Abb. 10 und 11) verhalten sich immer gleichsinnig, das zeigen besonders die Kurven der Abbildungen. In den absoluten Größen der Daten weichen jedoch die beiden Arten ein wenig voneinander ab. Die beiden Chlorophylle nehmen in den ersten 15–20 Stunden stark zu, dann nimmt die Bildungsgeschwindigkeit zunehmend ab und die Kurven erreichen den konstanten Entwertwert (Gerste: a 0,7; b 0,27 mg; Mais: a 0,9; b 0,37 mg). Dieser Endwert ist bei beiden Arten nach etwa 2 Tagen erreicht. Die gebildete Menge an Chlorophyll ist in den ersten 20 Stunden in den Maisblättern geringer als in den Gersteprimärblättern.

Erst nach 28 Stunden ist der Pigmentgehalt des Mais größer als der der Gerste. Der Beginn der Verminderung der Bildungsgeschwindigkeit der Chlorophylle tritt nach 15 (Gerste) bzw. 20 (Mais) Stunden ein. Deutlich

Tab. 11. *Anstieg des Blattpigmentgehaltes in belichteten etiolierten Gersteprimblättern und das Verhalten der Assimilation und der Atmung während des Ergrünungsprozesses.*

Pigmente in mg/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Atmung und Assimilation in mg CO<sub>2</sub>/h/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Temperatur 28° C, Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsmessungen zweimal 20.000 Lux.

Zeit in Std.	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$	Ap. Ass.	Atm.	Ges. Ass.	Ass. a
0	—	—	0,005	0,078	—	13,60	—	—	0,41	—	—
5	0,119	0,025	0,003	0,027	4,76	9,00	4,80	1,22	0,60	1,82	15,25
10	0,233	0,072	0,019	0,043	3,24	2,26	4,92	2,45	0,62	3,07	13,20
15	0,514	0,181	0,022	0,072	2,84	3,27	7,39	3,38	0,55	3,93	7,65
20	0,575	0,194	0,038	0,075	2,96	1,97	6,81	3,33	0,58	3,91	6,81
28	0,646	0,271	0,043	0,084	2,38	1,95	7,22	3,33	0,61	3,94	6,11
44	0,708	0,275	0,037	0,082	2,57	2,21	8,26	3,26	0,55	3,81	5,38
68	0,708	0,263	0,047	0,082	2,69	1,74	7,53	2,86	0,41	3,27	4,61

zeigt sich eine Verzögerung der Ausbildung von Chlorophyll b in den ersten Stunden; nach 5 Stunden beträgt  $\frac{a}{b}$  bei der Gerste fast 5, beim Mais über 3 und sinkt dann langsam auf den für beide Arten normalen Wert, der etwa

Tab. 12. *Anstieg des Blattpigmentgehaltes in belichteten etiolierten Maisprimblättern und das Verhalten der Assimilation und der Atmung während des Ergrünungsprozesses.*

Pigmente in mg/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Atmung und Assimilation in mg CO<sub>2</sub>/h/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Temperatur 28° C, Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsmessungen zweimal 20.000 Lux.

Zeit in Std.	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$	Ap. Ass.	Atm.	Ges. Ass.	Ass. a
0	—	—	0,004	0,067	—	16,75	—	—	0,35	—	—
5	0,110	0,035	0,009	0,070	3,14	7,78	1,83	0,54	0,38	0,92	8,35
10	0,216	0,070	0,021	0,068	3,09	3,24	3,21	2,49	0,49	2,98	13,80
15	0,361	0,131	0,036	0,114	2,76	3,17	3,28	4,06	0,63	4,69	12,99
20	0,507	0,165	0,043	0,114	3,07	2,65	4,48	4,75	0,63	5,38	10,60
28	0,783	0,310	0,061	0,121	2,53	1,98	6,01	3,94	0,47	4,41	5,64
44	0,888	0,311	0,067	0,147	2,86	2,19	5,60	4,93	0,43	5,36	6,04
68	0,889	0,371	0,070	0,154	2,40	2,20	5,63	4,61	0,38	4,99	5,61

nach 15 Stunden erreicht wird (beide Versuchspflanzen etwa 2,5 bis 2,7). Auf die zu Beginn des Ergrünungsprozesses verzögerte Bildung von b gegenüber a haben schon Seybold und Egle (1938) hingewiesen (vgl. auch

Blauuw-Jansen, Komen und Thomas 1950, Goodwin und Owen 1947). Der Gehalt an gelben Pigmenten ist vor der Belichtung für beide Spezies etwa gleich (c 0,005; x 0,07 mg). Nach 5 Stunden Belichtungs-

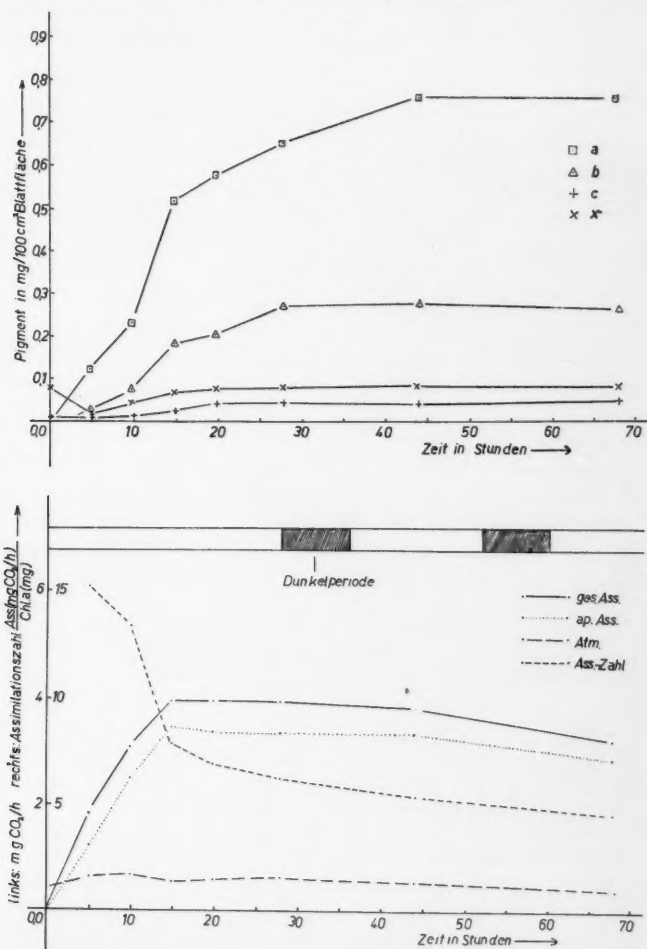


Abb. 10. Ausbildung der Plastidenpigmente. Assimilationsleistungen und Atmung belichteter etiolierter Gersteprimärblätter während des Ergrünungsprozesses. Zu Versuchsbeginn sind die Keimlinge 8 Tage alt. Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsleistung zweimal 20.000 Lux. Temperatur 28° C.

zeit hat der Gehalt bei der Gerste an c und x stark abgenommen. In den Maisblättern dagegen ist er in diesem Zeitraum konstant geblieben; c hat sogar zugenommen. Die Abnahme des Carotingehaltes in den ersten Stun-

den der Belichtung stimmt mit den Beobachtungen von Rudolf (1934) und Seybold und Egle (1938) überein. Dann setzt bei beiden Arten (bei der Gerste nach 5, beim Mais erst nach 10 Stunden) eine Zunahme der gelben Pigmente ein. Die Gerstebblätter erreichen den ursprünglichen Xanthophyllgehalt nach 15–20 Stunden wieder. Er wird dann nicht überschritten. Dagegen steigt der Xanthophyllgehalt beim Mais bis zum Versuchsende weiter an. Nach 48 Stunden ist er etwa doppelt so groß wie zu Versuchsbeginn. Das Carotin nimmt bei beiden Arten bis zum Ende des Versuchs zu; in der zweiten Hälfte der Versuchszeit ist die Produktion jedoch verlangsamt. Das Verhältnis  $x$  zu  $c$  beträgt zu Anfang für Mais und Gerste etwa 16, fällt mit der Länge der Belichtungszeit und erreicht nach 20 Stunden den normalen Wert um 2.

Der Quotient  $\frac{a+b}{c+x}$  ist anfangs niedrig (Gerste 4,8; Mais 1,8) und wird dann größer. Bei der Gerste erreicht er den Endwert (7–8) schon nach 15 Stunden, während er sich beim Mais erst nach 28 Stunden einstellt (etwa 6). Zusammenfassend ist über die Pigmentbildung bei beiden Gramineenarten zu sagen, daß sie prinzipiell gleich verläuft. Der Mais erreicht für alle Pigmente einen höheren Gehalt; die Bildungsgeschwindigkeit ist aber gegenüber der Gerste zu Anfang verzögert, so daß die Quotienten der einzelnen Farbstoffe erst später (nach 20 Std.) als bei der Gerste (15 Std.) normal werden.

Die Assimilationsleistung steigt mit einsetzender Belichtung sofort steil an. Ebenso wie bei den Chlorophyllen sind die Werte für den Mais niedriger als die der Gerste. Die Gerste überschreitet den Kompensationspunkt etwa nach 2 (Abb. 10), der Mais erst nach 3 Stunden (Abb. 11). Die größte photosynthetische Leistung setzt bei der Gerste schon nach 15 (3,9 mg CO<sub>2</sub>/h), beim Mais (5,4 mg CO<sub>2</sub>/h) erst nach 20 Stunden ein. Gegen Ende des Versuchs fällt die Assimilation bei beiden Arten ab. Interessant ist das Verhalten der Atmung während des Ergrünungsprozesses. Vor der Belichtung beträgt sie für beide Versuchspflanzen etwa 0,4 mg CO<sub>2</sub>/h. Dieser Wert nimmt in der ersten Zeit der Belichtung um etwa 50% auf 0,6 mg CO<sub>2</sub>/h zu. Dieser Anstieg ist jedoch beim Mais gegenüber der Gerste wiederum verzögert. Die Gerste erreicht diesen Wert schon nach 5, der Mais erst nach 15 Stunden. Nach einer etwa 24stündigen Belichtung fällt die Atmung wieder auf ihren Ausgangswert ab. Der Abfall der Gesamtassimilation nach 2 und 3 Tagen ist teilweise auf diese Verminderung der Atmungsintensität zurückzuführen. Die letzte Spalte der Tabellen enthält die von Willstätter und Stoll (1918) eingeführte Assimilationszahl, sie ist das Verhältnis zwischen Assimilationsleistung und Chlorophyllgehalt. In der eigenen Arbeit ist die Assimilationsleistung auf den Gehalt an Chlorophyll a bezogen worden.

Um ein Maß für die erreichten Entwicklungsstadien der Chloroplasten während des Ergrünungsprozesses zu erhalten, wurden die Chloroplasten in dem Zeitpunkt, in dem die ergrünenden Blätter ihre maximale Assimilation erreichten, mikroskopisch untersucht; also nach 15 (Gerste) bzw. 20 Stunden (Mais) Belichtungszeit. Es stellte sich heraus, daß bei beiden Versuchs-

pflanzen die Granastruktur der Chlorophyllkörner völlig ausgebildet war. Auch beim Vergleich der nach Etiolement ergrüntten Chloroplasten mit Plastiden der Blätter der gleichen Art, die bei natürlichen Belichtungsverhält-

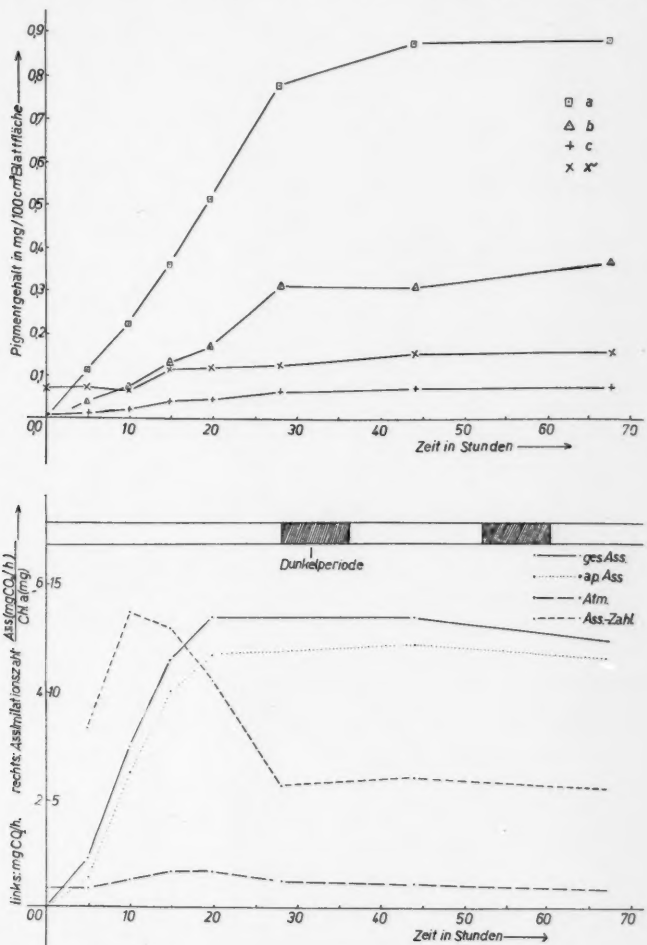


Abb. 11. Ausbildung der Plastidenpigmente, Assimilationsleistung und Atmung belichteter etiolierter Maisprimärblätter während des Ergrünungsprozesses. Zu Versuchsbeginn sind die Keimlinge 15 Tage alt. Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsleistung zweimal 20.000 Lux. Temperatur 28° C.

nissen aufgewachsen waren, zeigten sich weder in der Größe noch in der Granastruktur Unterschiede. Lediglich die Grünfärbung der Chloroplasten der Vergleichspflanzen war etwas intensiver.

## c) Diskussion

Die eigenen, den zeitlichen Verlauf der Pigmentausbildung in etiolierten Blättern von *Hordeum sativum* und *Zea Mays* bei Belichtung betreffenden Ergebnisse sind eine Bestätigung der von Seybold und Egle (1938) an verschiedenen Versuchspflanzen (*Phaseolus vulgaris*, *Triticum vulgare* und *Lepidium sativum*) gefundenen Werte. Zweck der eigenen Untersuchung war es, den Anstieg des Blattpigmentgehaltes mit dem Anstieg der Assimilationsleistung und dem Atmungsverhalten zu vergleichen und zwischen diesen Prozessen bestehende Gesetzmäßigkeit aufzuzeigen.

Die Assimilationsleistung steigt wie der Chlorophyllgehalt sofort steil an, erreicht aber schon nach 15–20 Stunden ihren maximalen Wert. Nach 15–20 Stunden haben auch die Verhältnisse der einzelnen Assimilationspigmente  $\left(\frac{a}{b}; \frac{x}{c}; \frac{a+b}{c+x}\right)$  ihren normalen Wert erreicht. Die cytologische Analyse ergab, daß zugleich nach dieser Zeit die Chloroplasten ihre normale Granastruktur ausgebildet haben.

Die Ergebnisse der Versuche von Blauuw-Jansen, Komen und Thomas (1950), die bei belichtetem, achttägigem etioliertem Hafer schon nach 6 Stunden Belichtungszeit die maximale Assimilation und den normalen Wert von  $\frac{a}{b}$  festgestellt haben, stimmen mit den eigenen Versuchen nicht überein.

Doch gibt ihre Arbeitsmethode zu Bedenken Anlaß, denn die Assimilationsmessungen erfolgten an zerschnittenen Blättern nach der Warburgmethode. Die Blätter ergrünt an der Pflanze bei der Lichtstärke von 1000 Lux; bei dieser Lichtstärke sind bei den eigenen Versuchspflanzen die Spaltöffnungen nach so kurzer Zeit noch völlig geschlossen. Nach Gassner und Goetze (1934) geht aber die Assimilationsleistung und die Transpiration der Blätter parallel. In dem von den drei holländischen Autoren verwendeten Zustand der Blätter ist zweifellos keine maximale Transpiration und damit auch keine maximale Assimilation möglich. Ihre absoluten maximalen Assimilationswerte (8 ml/O<sub>2</sub>/h/100 mg Frischmaterial) entsprechen etwa 250 bis 300 mg CO<sub>2</sub>/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Solche außerordentlich hohe Assimilationswerte sind in der Literatur noch nicht publiziert (vgl. Willstätter und Stoll 1918).

Der Abfall der Assimilationszahl bei höheren Pigmentgehalten wurde auch von anderen Autoren nachgewiesen (Willstätter und Stoll 1918, van Hille 1938, Baumeister 1952 b). Ebenso schwankt das Verhältnis zwischen Assimilationsleistung und Chlorophyllgehalt bei verschiedenen Arten sehr (Arnold und Kohn 1954, Willstätter und Stoll 1918, Emerson 1929, Fleischer 1934, Gassner und Goetze 1934, Gessner 1945 u. a.). Aurea-Varietäten haben immer eine sehr große Assimilationszahl; in normalen Blättern ist das Chlorophyll im Überschuß vorhanden. Gabrielsen (1948) beweist, daß diese Folgerung nur für die Assimilation im „Starklicht“ gilt. Bei geringen Pigmentgehalten ist die Assimilation bei schwachen Lichtintensitäten bedeutend stärker herab-



gesetzt als in Blättern mit großem Chlorophyllgehalt. Gabrielsen bezeichnet daher den Chlorophyllgehalt als einen „Schwachlichtfaktor“ der Assimilation. Auf Grund der eigenen Ergebnisse muß aber festgestellt werden, daß bei sehr geringen Chlorophyllgehalten, wie sie in den ergrünenden etiolierten Blättern in der ersten Zeit der Belichtung auftreten, der Chlorophyllgehalt auch als „Starklichtfaktor“ wirksam ist. Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß der Spaltöffnungszustand in den ersten 15 bis 20 Stunden eine Abhängigkeit vom Chlorophyllgehalt zeigt, wie schon Gassner und Goetze (1934) vermuten. Erst mit Erreichen der vollen Assimilationsleistung haben die Schließzellen der Spaltöffnungen ihr volles Bewegungsvermögen erreicht. Auch eine geringe Öffnungsweite der Stomata kann eine Behinderung der Assimilation bedingen.

Die Steigerung der Atmungsintensität um etwa 50% während der Periode der stärksten Blattfarbstoffsynthese und der Ausbildung des vollen Assimilationsvermögens muß wohl auf einen erhöhten Energieverbrauch für den Aufbau des Assimilationsapparates zurückgeführt werden.

#### **V. Pigmentgehalt, Assimilationsleistung und Atmung ergrünter etiolierter Primärblätter und der Primärblätter unter normalen Belichtungsverhältnissen aufgewachsener Vergleichspflanzen von Mais**

Der Vergleich der Plastiden in ergrünenden etiolierten Blättern mit den Chloroplasten in Blättern von Vergleichspflanzen derselben Art, die unter normalen Belichtungsverhältnissen aufgewachsen waren, hat gezeigt, daß die Plastiden in beiden Fällen morphologisch völlig gleich sind (Strugger 1937, 1950; Böing 1953).

Es sollte daher im Rahmen der eigenen physiologischen Untersuchungen versucht werden, die Assimilationsleistung, die Atmung und den Pigmentgehalt der ergrünenden etiolierten und der normal ergrünenden Blätter zu vergleichen, um festzustellen, wie weit auch hier die gleiche Übereinstimmung vorliegt. Auf Grund der Untersuchungen von Willstätter und Stoll (1918) wissen wir, daß der Pigmentgehalt und die Assimilation in jungen, wachsenden Blättern von Laubbäumen und Sträuchern anfangs eine starke Zunahme erfahren. Während dann der Pigmentgehalt weitgehend konstant bleibt, fällt die Assimilationsleistung wieder ab. Es ist also schwierig, den Zeitpunkt zu wählen, an dem die physiologische Leistung der normal ergrünenden mit der Leistungsfähigkeit der nach Etiolement ergrünenden Primärblätter vergleichbar ist bzw. verglichen werden darf. Weiter kommt erschwerend hinzu, daß auch die Ausbildung der Blattpigmente in belichteten etiolierten Blättern stark von der Länge der Dunkelkultur abhängig ist (Rudolf 1934, dort auch weitere Literatur). Es war daher erforderlich, den Einfluß des Blattalters auf die untersuchten physiologischen Prozesse bei unter normalen Belichtungsverhältnissen aufgewachsenen Blättern zu untersuchen. Zum anderen mußte der Einfluß der Länge der Dunkelkultur auf die Ausbildung der Plastidenpigmente und der Assimilationsleistung belichteter etiolierter Blätter bestimmt werden. Die jeweils höchsten Pigmentgehalte und Assimilationswerte sollen dann für den Vergleich der physio-

logischen Leistung der ergrünteten etiolierten und der normal ergrünteten Blätter herangezogen werden.

Prinzipiell kann festgestellt werden, daß die Pigmentbildung, die Assimilation und die Atmung der Primärblätter von Gerste und Mais unter den

Tab. 13. *Abhängigkeit der Pigmentbildung, der Assimilationsleistung und der Atmung normal ergrünter Primärblätter der Gerste von ihrem Lebensalter (Zeit in Tagen von der Aussaat an).*

Belichtungszeit täglich 17 Stunden. Pigment in mg/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Temperatur 28° C, Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsmessungen zweimal 20.000 Lux.

Alter nach der Aussaat	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$	Ap. Ass.	Atm.	Ges. Ass.
6	0,901	0,429	0,064	0,132	2,10	2,06	6,79	1,43	1,28	2,71
8	0,952	0,445	0,067	0,146	2,14	2,18	6,55	3,14	0,75	3,89
10	0,998	0,410	0,080	0,138	2,43	1,73	6,46	2,96	0,88	3,84
12	1,047	0,429	0,103	0,175	2,44	1,70	5,31	2,70	0,27	2,97

angewandten Versuchsbedingungen die gleichen Tendenzen aufweisen. Jedoch sind die Werte beim Mais bedeutend höher als bei der Gerste.

Beide Versuchspflanzen zeigen bei täglicher 17stündiger Belichtung von der Aussaat bis zum Versuchsende eine laufende Zunahme der Blattpigmente. Bei der Gerste steigt die Assimilation bis zum 8. Tage nach der Aussaat an, bleibt 2 bis 3 Tage konstant und fällt dann wieder ab. Beim Mais

Tab. 14. *Abhängigkeit der Pigmentbildung, der Assimilationsleistung und der Atmung belichteter etiolierter Primärblätter der Gerste von der Länge der Dunkelkultur (Zeit in Tagen von der Aussaat an).*

Belichtungszeit 5 Tage. Pigment in mg/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Atmung und Assimilation in mg CO<sub>2</sub>/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Temperatur 28° C, Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsmessungen zweimal 20.000 Lux.

Dauer der Dunkelkultur in Tagen	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$	Ap. Ass.	Atm.	Ges. Ass.
12	0,330	0,155	0,044	0,087	2,13	1,98	3,70	1,99	0,24	2,23
8	0,708	0,263	0,047	0,082	2,69	1,74	7,53	2,86	0,41	3,27
6	1,140	0,500	0,076	0,164	2,28	2,16	6,83	3,28	0,43	3,71

wurde nur ein Abfall der Assimilationsleistung festgestellt. Wahrscheinlich haben die Maisprimärblätter den Anstieg der Assimilation schon beendet, bevor die Blätter völlig entfaltet sind: also noch vor der ersten Bestimmung nach 11 Tagen. Die eigenen Versuche an Getreidepflanzen decken sich mit den Feststellungen von Willstätter und Stoll (1918) an jungen Blättern von Laubbäumen; auch hier wurde zuerst ein Anstieg, dann ein Abfall der Assimilationsleistung festgestellt. Die Versuche von Baumeister (1952 b)

können zum Vergleich nicht herangezogen werden, da die Blätter erst nach Beendigung des Wachstums untersucht werden.

Der starke Abfall der Atmung während des Versuchs ist sehr aufschlußreich. Es ist wohl anzunehmen, daß die große Atmungsintensität während

Tab. 15. *Abhängigkeit der Pigmentbildung, der Assimilationsleistung und der Atmung normal ergrünter Maisprimärblätter von ihrem Lebensalter (Zeit in Tagen von der Aussaat an).*

Belichtungszeit täglich 17 Stunden. Pigment in mg/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Atmung und Assimilation in mg CO<sub>2</sub>/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Temperatur 28° C, Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsmessungen zweimal 20.000 Lux.

Alter nach der Aussaat	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$	Ap. Ass.	Atm.	Ges. Ass.
11	1,707	0,618	0,162	0,286	2,76	1,77	5,19	8,83	0,74	9,57
13	2,029	0,701	0,164	0,291	2,90	1,77	6,00	8,38	0,93	9,31
15	2,430	0,836	0,225	0,386	2,91	1,72	5,35	4,78	0,43	5,21
17	2,369	0,803	0,212	0,397	2,95	1,79	6,23	4,36	0,33	4,69

der ersten Zeit der Belichtung durch den Energieverbrauch für das starke Wachstum und die Ausbildung des photosynthetischen Apparates bedingt ist. Mit nachlassendem Wachstum fällt die Atmung wieder auf ihren ursprünglichen Wert. Willstätter und Stoll (1918) fanden ebenfalls einen starken Abfall der Atmung mit Beendigung des Wachstums der Blätter. Bei schnell wachsenden Frühjahrspflanzen stellte Baumeister

Tab. 16. *Abhängigkeit der Pigmentbildung, der Assimilationsleistung und der Atmung belichteter etiolierter Maisprimärblätter von der Länge der Dunkelkultur (Zeit in Tagen von der Aussaat an).*

Belichtungszeit 3 Tage. Pigment in mg/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Atmung und Assimilation in mg CO<sub>2</sub>/h/100 cm<sup>2</sup> Blattfläche. Temperatur 28° C, Lichtintensität 5000 Lux, während der Assimilationsmessungen zweimal 20.000 Lux.

Dauer der Dunkelkultur in Tagen	a	b	c	x	$\frac{a}{b}$	$\frac{x}{c}$	$\frac{a+b}{c+x}$	Ap. Ass.	Atm.	Ges. Ass.
17	0,542	0,250	0,055	0,079	2,17	1,44	5,91	4,62	0,46	5,08
15	0,889	0,371	0,070	0,154	2,40	2,20	5,63	4,61	0,38	4,99
13	1,475	0,542	0,113	0,198	2,72	1,75	6,49	8,05	0,67	8,72

(1952 b) gleichfalls eine stark erhöhte Atmung fest, die im Durchschnitt noch bedeutend intensiver ist als bei den eigenen Versuchen. Aus den Tab. 14 und 16 ist eine starke Abhängigkeit der physiologischen Leistungsfähigkeit der ergrünteten etiolierten Blätter von der Länge der Dunkelzeit ersichtlich. Beim Mais beträgt die nach dreitägiger Belichtungszeit gebildete Pigmentmenge nach 17 Tagen vorhergehender Dunkelkultur nur noch etwa ein Drittel der Menge, die nach 13tägiger Dunkelzeit gebildet wird. Je kürzer der Aufenthalt im Dunkelraum ist, um so größer ist die physiologische

Leistungsfähigkeit. Daraus muß geschlossen werden, daß die Blätter bei längerem Aufenthalt im Dunkeln stark geschädigt werden. Die Assimilationsleistung der Blätter ist jedoch relativ hoch. Sie fällt aber ebenso wie die Atmung mit der Verlängerung der Dunkelkultur ab. Die höchste Assimilationsleistung der normal ergrüntten Pflanzen beträgt beim Mais 9,57 und bei der Gerste 3,89 mg CO<sub>2</sub>/h, während sie bei den nach Etiolement ergrüntten Pflanzen beim Mais 8,72 und bei der Gerste 3,71 mg CO<sub>2</sub>/h ausmacht. Es kann also als gesichert angesehen werden, daß nach kurzer Dunkelkultur die Assimilation der ergrüntten etiolierten Blätter die gleiche Intensität erreicht wie die der normal ergrüntten Blätter. Die Gersteblätter haben nach kurzer Dunkelkultur einen höheren Chlorophyllgehalt als die normal ergrüntten Blätter. Die gelben Pigmente bleiben aber hinter dem Gehalt der normal ergrüntten Blätter zurück. Der Pigmentgehalt der ergrüntten etiolierten Maisprimärblätter ist dagegen immer weit geringer als der der normal ergrüntten Versuchspflanzen.

Damit ist die Identität der Plastiden in ergrüntten etiolierten und in normal ergrüntten Blättern auch in physiologischer Hinsicht weitgehend sichergestellt.

### Zusammenfassung

1. Die quantitative Bestimmung der vier Blattpigmente erfolgte nach der chromatographischen Trennung auf Kartoffelstärke photometrisch mit dem Leitz-Photometer Leifo K.

2. Der Einfluß von Lichtintensität, Temperatur und der Alkaliionen wurde an abgeschnittenen etiolierten Rapskotyledonen untersucht. Die Pigmentbildung in abgetrennten Rapskeimblättern ist nur geringfügig gegenüber der in Cotyledonen an der intakten Pflanze verzögert.

3. Das Optimum für die Ausbildung der Chlorophylle liegt etwa bei 1000 Lux. Von da fällt die Kurve zu niedrigen Lichtintensitäten sehr steil, zu höheren flach ab. Die Carotinoide, besonders das Xanthophyll, werden oberhalb des Chlorophylloptimums mit zunehmender Lichtstärke verstärkt ausgebildet.

4. Das Temperaturoptimum für die Ausbildung von Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotin befindet sich bei 28° C. Die Ausbildung des Xanthophylls ist etwa bei 35° C optimal. Das Temperaturmaximum für die Chlorophylle hat einen Wert von wenig über 40° C; bei dieser Temperatur werden die Carotinoide noch stark ausgebildet. Unterhalb der Optima verringert sich die pro Zeiteinheit gebildete Menge der Farbstoffe mit fallender Temperatur nur langsam. Bei niedrigen Temperaturen und gleichzeitig mittleren Lichtintensitäten, ebenso bei hohen Lichtintensitäten und gleichzeitig mittleren Temperaturen ist eine starke Anthocyanbildung festzustellen.

5. Die Befunde werden in Übereinstimmung mit der Theorie von Rudolf, der die Carotinoide als Chlorophyllvorstufe betrachtet, so gedeutet, daß unter diesen Bedingungen der Verbrauch der Carotinoide für die Chlorophyllsynthese blockiert ist, während die Bildung der Carotinoide

unbehindert weiterläuft. Die eigenen Ergebnisse sind eine Stütze für die Hypothese Rudolfs. Die starke Ausbildung der gelben Pigmente unter extremen Bedingungen kann auch im Sinne der Chlorophyllschutzfunktionshypothese der Carotinoide von Iwanowski gedeutet werden.

6. Die Blättchen wurden mit den Lösungen der Alkalisalze im Vakuum infiltriert. Die Alkaliionen hemmen die Blattpigmentausbildung vollständig in folgenden Konzentrationen: LiCl 0,1 n; RbCl und CsCl 0,15 n; NaCl und KCl 0,30 n. Bei allen Alkaliionen ist der Abfall der Pigmentbildung pro Zeiteinheit mit steigender Konzentration der Lösungen annähernd linear. Alle vier Plastidenfarbstoffe werden immer gleichmäßig beeinflusst, so daß das mengenmäßige Verhältnis der Pigmente zueinander immer gleichbleibt. Für alle Farbstoffe gilt bei gleicher Konzentration der Alkalichloridlösungen die Reihe (nach zunehmender Giftwirkung angeordnet): Na, K < Cs < Rb < Li. Da die Bildung aller vier Pigmente immer gleichsinnig beeinflusst wird, muß eine allgemeine Wirkung der Ionen auf den gesamten Protoplasten angenommen werden.

7. Die Assimilations- und Atmungsmessungen wurden mit dem Ultrarot-Absorptionsschreiber durchgeführt. Die belichteten etiolierten Mais- und Gersteprimärblätter haben nach 15–20stündiger Belichtungszeit ihre volle Assimilation erreicht, während der Blattpigmentgehalt noch weiter zunimmt. Zu diesem Zeitpunkt haben die Quotienten der Plastidenpigmente  $\left(\frac{a}{b}; \frac{x}{c}; \frac{a+b}{c+x}\right)$  ihren normalen Wert angenommen; zugleich ist die Granstruktur voll ausgebildet. Jetzt haben auch die Schließzellen der Stomata ihr volles Bewegungsvermögen erlangt. In den ersten Stunden der Belichtung öffnen sich die Spaltöffnungen auch bei den stärksten Lichtintensitäten nicht. Es muß also ein Zusammenhang zwischen Pigmentgehalt und Spaltöffnungszustand angenommen werden. Während der etwa 15–20 Stunden dauernden Zeitspanne der stärksten Blattpigmentsynthese und der gleichzeitigen Ausbildung des vollen Assimilationsvermögens ist die Atmung um rund 50% erhöht, sie fällt dann wieder auf den normalen Wert ab.

8. Der Pigmentgehalt der Primärblätter beider Versuchspflanzen nimmt beim Wachstum der Keimlinge unter normalen Belichtungsverhältnissen etwa 2–3 Wochen laufend zu. Dagegen zeigt die Assimilation ungefähr bis zum 10. Lebenstag einen Anstieg und fällt dann ab. Die Atmung ist zunächst sehr intensiv und läßt mit fortschreitender Zeit erheblich nach.

9. Je größer die Zeitdauer der Dunkelkultur ist, um so geringer sind nach dreitägiger Belichtung der Pigmentgehalt, die Assimilationsleistung und die Atmungsintensität.

10. Primärblätter nur kurze Zeit im Dunkeln kultivierter Keimlinge erreichen die gleiche Assimilationsleistung wie die normal ergrünzten Blätter. Der Pigmentgehalt der nach Etiolement ergrünzten Blätter der Gerste ist etwa so groß wie der der normal aufgewachsenen Blätter; beim Mais ist er jedoch immer viel niedriger als in den Kontrollpflanzen. Damit ist die Identität der Plastiden in ergrünzten etiolierten und normal ergrünzten Blättern auch in physiologischer Hinsicht weitgehend sichergestellt.

## Literatur

- Arnold, W., and H. Kohn, 1934: The chlorophyll unit in photosynthesis. *J. gen. physiol. (Am.)* 18, 109.
- Bauer, L., 1943: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. *Flora* 136, 47.
- Baumeister, W., 1952 a: Mineralstoffe und Pflanzenwachstum. Fischer, Jena.
- 1952 b: Zur Anwendung des Ultrarotabsorptionsschreibers für CO<sub>2</sub>-Assimilationsmessungen an abgeschnittenen Blättern im Labor. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 65, 362.
- Blauuw-Jansen, G., J. G. Komen and J. B. Thomas, 1950: On the relation between the formation of assimilatory pigments and the rate of photosynthesis in etiolated oat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta* 5, 179.
- Böing, J., 1955: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Chloroplasten. Dissertation, Münster.
- Drautz, R., 1935: Über die Wirkung äußerer und innerer Faktoren bei der Kohlensäureassimilation. *Jb. wiss. Bot.* 82, 171.
- Egle, K., 1944: Untersuchungen über die Resistenz der Plastidenfarbstoffe. *Bot. Archiv* 45, 95.
- und A. Ernst, 1949: *Z. Naturforsch.* 4 b, 351.
- Emerson, R., 1929: Relation between rate of photosynthesis and chlorophyll concentration. *J. gen. physiol. (Am.)* 12, 609.
- Engelmann, W. T., 1887: Die Farben bunter Laubblätter und ihre Bedeutung für die Zerlegung der Kohlensäure im Licht. *Bot. Ztg.* XLV, 393—398; 409—419; 425—436; 441—450; 457—465.
- Fasse-Franzisket, 1955: Dissertation, Münster i. Westf.
- Fitting, H., 1915: Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. *Jb. wiss. Bot.* 56, 1.
- Fleischer, Wf. F., 1934: The relation between chlorophyll content and rate of photosynthesis. *J. gen. physiol. (Am.)* 18, 573.
- Führlinger, H., 1938: Plasmolyse verhindert Ergrünen. *Protoplasma* 30, 328.
- Gabrielsen, E. K., 1948: Effects of different chlorophyll concentrations on photosynthesis in foliage leave. *Physiologia Plantarum* 1, 5.
- Gassner, G., und G. Goetze, 1934: Assimilationsverhalten, Chlorophyllgehalt und Transpirationsgröße von Getreideblättern mit besonderer Berücksichtigung der K- und N-Ernährung. *Z. Bot.* 27, 257.
- Gessner, F., 1943: Die assimilatorische Leistung des Phytoplanktons bezogen auf seinen Chlorophyllgehalt. *Z. Bot.* 38, 414.
- Goodwin, R. H., and O. v. H. Owens, 1947: The formation of chlorophyll in etiolated oat seedling. *Plant Physiol.* 22, 197.
- Harder, R., 1930: Über die Assimilation der Kohlensäure bei konstanten Außenbedingungen I. *Planta* 11, 263.
- 1933: Über die Assimilation der Kohlensäure bei konstanten Außenbedingungen II. *Planta* 20, 699.
- Hille, J. G. van, 1938: The quantitative relation between rate of photosynthesis and chlorophyll content in *Chlorella pyrenoidosa*. Proefschrift. Universiteit Utrecht.
- Hoeber, R., 1926: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Bern 1926.
- 1948: Physical chemistry of cells and tissues. Philadelphia-Toronto.
- Höfler, K., 1940: Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. *Protoplasma* 33, 545.



- Irving, A. A., 1910: The beginning of photosynthesis and the development of Chlorophyll. *Ann. Bot.* 24, 805.
- Iwanowski, D., 1914: Ein Beitrag zur physiologischen Theorie des Chlorophylls. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 32, 433.
- Kaiserlehner, E., 1940: Über Kappenplasmolyse und Entmischungsvorgänge im Kappenplasma. *Protoplasma* 33, 579.
- Kathen, 1950: Über die Ermittlung der chemischen Konstitution von Algenlipoiden mit Hilfe der Adsorptionsmethode. *Arch. Mikrobiol.* 14, 602.
- Keller, R., und J. Gicklhorn, 1928: Methoden der Bioelektrostatik. In: A. B. derhalden, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. 5, Teil 2. Heft 11, 1189.
- Kuilman, L. W., 1930: Physiologische Untersuchungen über die Anthocyane. *Rec. trav. bot. neerld.* 27, 287.
- Kumar Kar, Baikuntha, 1937: Über das Verhalten der Plastidenfarbstoffe photoperiodisch reagierender Pflanzen bei verschiedenem Lichtgenuß. *Planta* 26, 420.
- Küster und Thiel, 1947: *Logarithmische Rechentafeln*. Berlin.
- Lärz, H., 1942: Beiträge zur Pathologie der Chloroplasten. *Flora* 135, 319.
- Lubimenko, V. N., and Hubbenet, 1932: The influence of temperature on the rate of accumulation of chlorophyll in etiolated seedlings. *The New Phytologist* 31, 26.
- Noack, K., und W. Kiessling, 1929: Zur Entstehung des Chlorophylls und seine Beziehung zum Blutfarbstoff. *Z. physiol. Chemie* 182, 193.
- — 1931: Zur Kenntnis der Chlorophyllbildung. *Z. angew. Chemie* 44, 93.
- Rabinowitsch, E., 1945: *Photosynthesis I*. New York.
- 1951: *Photosynthesis II*, 1. New York.
- Rudolf, H., 1934: Über die Einwirkung des farbigen Lichtes auf die Entstehung der Chloroplastenfarbstoffe. *Planta* 21, 104.
- Pirschle, K., 1930: Zur physiologischen Wirkung homologer Ionenreihen. *Jb. wiss. Bot.* 72, 335.
- 1932: Untersuchungen über die physiologische Wirkung homologer Ionenreihen II. *Jb. wiss. Bot.* 76, I.
- 1935: Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger*. *Planta* 23, 177.
- Pirson, A., 1939: Über die Wirkung von Alkaliionen auf Wachstum und Stoffwechsel von *Chlorella*. *Planta* 29, 231.
- 1949: Stoffwechsel organischer Verbindungen I. *Fortschritte der Botanik* 12, 246.
- und K. Keller, 1932: Physiologische Wirkungen des Rubidiums. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 65, 276.
- Sachs, J. v., 1862: Übersicht der Ergebnisse der neueren Untersuchungen über das Chlorophyll. *Flora* 45, 129.
- 1864: Über den Einfluß der Temperatur auf das Ergrünen der Blätter. *Flora* 47, 497.
- Scharfnagel, W., 1931: Biologische Untersuchungen zur Chlorophyllbildung. *Planta* 13, 716.
- Seybold, A., 1937: Zur Kenntnis des Protochlorophylls. *Planta* 26, 712.
- 1930: Zur Chromatographie der Blattfarbstoffe (eine Erwiderung). *Planta* 38, 601.
- und K. Egle, 1937: Lichtfeld und Blattfarbstoffe I. *Planta* 26, 490.
- — 1938: Zur Kenntnis des Protochlorophylls 2. *Planta* 29, 118.
- — 1939: Zur chromatographischen Methode der Blattpigmente. *Planta* 29, 114.



- Simonis, W., 1938: Der Einfluß verschiedenfarbigen Anzuchtlichtes auf die  $\text{CO}_2$ -Assimilation und den Farbstoffgehalt von *Helodea canadensis*. *Planta* 29, 129.
- Sjoeborg, K., 1931: Beitrag zur Kenntnis der Bildung des Chlorophylls und der gelben Pflanzenpigmente. *Biochem. Z.* 240, 156.
- Smith, H. H. C., 1948: Protochlorophyll. Precursor of Chlorophyll. *Arch. Biochem.* 19, 449.
- Stälfelt, M., 1939: Neuere Methode zur Ermittlung des Öffnungszustandes der Stomata. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von Abderhalden. Abt. XI, Teil 4, I. Hälfte. Berlin-Wien.
- Strodt, A., 1938: Der Einfluß der Umweltbedingungen auf die Ausbildung der Chloroplastenfarbstoffe. *Jb. wiss. Bot.* 86, I.
- Strugger, S., 1937 a: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. *Flora* 151, 113.
- 1937 b: Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. *Flora* 151, 324.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze, 2. Auflage. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten (vorläufige Mitteilung). *Die Naturwissenschaften* 37, 166.
- und W. Baumeister, 1951: Zur Anwendung des Ultrarotabsorptionsschreibers für  $\text{CO}_2$ -Assimilationsmessungen im Laboratorium. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 64, 5.
- Uyterhoeven, W., 1938: Elektrische Gasentladungslampen. Berlin.
- Weber, F., 1927: Vitale Blattinfiltration (eine zellphysiologische Hilfsmethode). *Protoplasma* 1, 581.
- Wendel, K., 1948: Beiträge zur photometrischen Messung von Chlorophylllösungen. *Planta* 56, 71.
- 1950: Beiträge zur chromatographischen Analyse von Chlorophylllösungen und deren colorimetrische und photometrische Messung. *Planta* 37, 604.
- Willstätter, R., und A. Stoll, 1913: Untersuchungen über das Chlorophyll. Berlin.
- — 1918: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin.

# Über Größen- und Strukturänderungen der Chloroplasten in Rohrzucker- und Elektrolytlösungen

Von

**Klaus Mudrack**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster in Westfalen

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. April 1956)

## A. Einleitung

Seit den klassischen Untersuchungen von Nägeli (1846) über „bläschenförmige Gebilde im Inhalt der Pflanzenzelle“ wurden im steigenden Maße experimentelle Untersuchungen an Chloroplasten durchgeführt. Da Nägeli die Chloroplasten als Bläschen mit einer distinkten Membran beschrieb, lag es nahe, durch Behandlung dieser Plasmaeinschlüsse mit hypo- und hypertonschen Medien näheren Aufschluß über ihre Struktur zu erhalten. So findet man bei fast allen Untersuchern mehr oder weniger ausführliche Beschreibungen der Veränderungen, welche die Chloroplasten unter der Einwirkung verschiedener plasmolytisch wirksamer Medien erleiden. Einen breiten Raum nehmen die Untersuchungen der Vakuolisationserscheinungen ein, die zuerst von Göppert und Cohn (1849) an *Nitella* nach Behandlung mit Leitungswasser beobachtet wurden. Eine zusammenfassende Übersicht über Vakuolisationserscheinungen gibt Küster (1937).

In der vorliegenden Arbeit soll die Größenänderung bei Plasmolyse und Deplasmolyse und die Strukturänderung der Chloroplasten in wässrigen Medien untersucht werden.

## B. Material und Methode

Als Untersuchungsobjekt dienten die Blätter von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. Standen die Pflanzen während der Sommermonate an einer schattigen Stelle im Freien, im Winter im Gewächshaus, so zeichneten sich die Chloroplasten durch ihre Größe, deutliche Granastruktur und Stärkefreiheit für die Untersuchungen als hervorragend geeignet aus.

Mit einem Rasiermesser wurden von der Blattunterseite etwa 20 mm<sup>2</sup> große Flächenschnitte aus dem voll ergrüntem Teil des Blattes hergestellt.

Diese wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe im Vakuum mit dem Untersuchungsmedium infiltriert und von der Schnittseite her beobachtet. Während der Dauer des Versuches wurden die Schnitte in Deckelschälchen (10 cm<sup>3</sup>) aufbewahrt, aus denen sie zur Beobachtung unter größter Schonung des Objektes entnommen wurden.

Da bei der Herstellung der Schnittpräparate stets ein Teil der Zellen geschädigt wird, war es notwendig, die untersuchten Zellen vor der Behandlung sorgfältig auf ihre volle Vitalität zu prüfen. Als Kriterien dienten die Plasmaströmung, die Struktur des Kernes und die hantelförmige Gestalt der Chondriosomen. Um eine sekundäre Schädigung durch die ausgetretene Vakuolenflüssigkeit der verletzten Zellen zu verhindern, wurde der Schnitt sorgfältig in Leitungswasser gewässert. Ferner wurde darauf geachtet, daß die ausgewählten Zellen nicht in unmittelbarer Nachbarschaft von beschädigten Zellen lagen.

Für die Herstellung der Lösungen wurden „p.a.“-Chemikalien der Firma Merck (Darmstadt) und über Quarz destilliertes Wasser verwendet. Die einzelnen Konzentrationsstufen der Lösungen wurden, von einer 1 mol. Stammlösung ausgehend, durch Verdünnen hergestellt.

Für die mikroskopischen Untersuchungen stand das binokulare Forschungsmikroskop BST 29/79 von Leitz mit den Objektiven 1/12 Öl, num. Ap. 1.30, 100:1 und 1/16 Fl Öl, num. Ap. 1.32, 114:1 und den Periplanokularen 6×, 8× und 10× zur Verfügung. Als Lichtquelle diente die Monlafix-Niedervoltlampe von Leitz. Für die Mikroaufnahmen wurde eine Leica in Verbindung mit dem Mikroaufsatz von Zeiss-Winkel verwendet. Die Zeichnungen für die Größenmessungen an Chloroplasten wurden mit dem Zeichenapparat nach Abbé von Leitz angefertigt und mit dem Polarplanimeter der Firma A. Ott, Kempten, ausgemessen.

### C. Größenänderung der Chloroplasten bei Plasmolyse

Wird eine lebende Zelle plasmolysiert, so findet ein Konzentrationsausgleich zwischen Außenmedium und Vakuolenflüssigkeit statt. Parallel dazu muß sich jedoch auch ein Gleichgewicht zwischen Außenmedium und Innenplasma einschließlich der darin liegenden Zellorganellen einstellen. Bei der gelartigen Konsistenz dieser Gebilde müßte der Vorgang durch eine Volumenabnahme zum Ausdruck kommen. Für den Zellkern konnte Abele (1951) die Volumenverminderung bei Plasmolyse nachweisen. Bei den Plastiden wurde eine gleiche Reaktion bisher nur an den großen Chromatophoren der Algen untersucht (De Vries 1889; Senn 1908; Gicklhorn 1935; Cholnoky 1935; Küster 1937; Eibl 1939; Osterhout 1946 a, b, 1947, 1948). Eine Größenabnahme der Chloroplasten höherer Pflanzen war danach wohl zu erwarten, wurde bisher jedoch nicht nachgeprüft. Lediglich Küster (1937) schreibt in diesem Zusammenhang: „Es mag schwer sein, bei kleinen Chlorophyllscheibchen sich über eine durch Entquellung veranlaßte Volumenabnahme Rechenschaft zu geben.“

Bei der mikroskopischen Untersuchung des linsenförmigen Chloroplasten von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. kann man als scharfe Begrenzung nur

die Projektion der Oberfläche beobachten, die in der Aufsicht als mehr oder weniger runde Scheibe, in der Seitenansicht als flache Ellipse erscheint. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Chloroplasten in der Aufsicht beobachtet und die Größen der Flächen gemessen. Eine Größenänderung der Fläche kann jedoch auf zwei Wegen erfolgen. Einmal kann der Chloroplast seine normale Linsenform behalten und durch gleichmäßige Entquellung sein Volumen verkleinern. Zum anderen ist es aber auch möglich, daß sich der Chloroplast ohne Volumenänderung abkugelt und dadurch in der Aufsicht kleiner erscheint. Nur im ersten Fall sind Flächenmessungen als Kriterium einer Volumenänderung möglich.

Es wurden daher in Vorversuchen die Durchmesser von jeweils 100 bis 150 Chloroplasten sowohl in der Aufsicht als auch in der Seitenansicht gemessen. Würde bei Plasmolyse eine Abkuglung stattfinden, so müßten die Durchmesser der Aufsicht abnehmen, die der Seitenansicht aber zunehmen. Die Messungen ließen jedoch erkennen, daß die Chloroplasten in der Aufsicht wohl deutlich kleiner wurden, die Durchmesser der Seitenansicht aber keine Größenzunahme zeigten. Es handelt sich bei der Volumenänderung der Chloroplasten also um eine gleichmäßige Entquellung. Die dabei hervorgerufene Volumenabnahme beträgt jedoch nur wenige Prozente des Gesamtvolumens. Daher werden wohl in der Flächenansicht mit der angewandten Methode meßbare Werte erreicht, in der Seitenansicht dagegen liegen die Werte innerhalb der Fehlergrenze.

Bei den Vorversuchen hatte sich weiterhin gezeigt, daß die Größe der Chloroplasten sehr unterschiedlich ist. Will man daher auf statistischem Wege zu gesicherten Ergebnissen kommen, müßte man jeweils eine sehr große Anzahl von Chloroplasten messen. Dadurch zieht sich jede Messung aber so stark in die Länge, daß die Chloroplasten meist geschädigt werden. Um dies zu vermeiden, ging ich so vor, daß jeweils bestimmte Chloroplasten einer bestimmten Zelle ausgewählt wurden, an denen dann die gesamte Meßreihe durchgeführt wurde. Der betreffende Gewebekomplex wurde skizziert, so daß die ausgewählte Zelle auch nach dem Aufenthalt des Schnittes im Deckelschälchen mit Sicherheit wieder erkannt werden konnte. Die Form der Zelle mußte dabei so beschaffen sein, daß mehrere Chloroplasten völlig parallel zur Oberfläche lagen und bei der Plasmolyse nicht seitlich gekippt wurden, da dann die Projektion ihres Umrisses eine Flächenabnahme vortäuschen konnte.

Ein Flächenschnitt der Blattunterseite von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. wurde mit Leitungswasser infiltriert und eine Zelle aus dem Mesophyllgewebe ausgewählt. Mit Hilfe des Zeichenapparates wurde die Zelle mit den Chloroplasten bei Beobachtung mit der 1/16 Fl Ölimmersion im Rotlicht gezeichnet und ihre Flächeninhalte mit dem Polarplanimeter bestimmt.

Der Plasmolysegrad wurde nach Höfler (1918) berechnet. Danach ergibt sich der Plasmolysegrad der Zelle ( $G_z$ ) aus dem Volumenverhältnis des plasmolysierten Protoplasten ( $V_p$ ) zur entspannten Zelle ( $V_z$ ). Da im vorliegenden Falle die Flächen gemessen wurden, lautet die entsprechende

Formel:  $G_z = F_p : F_z$ . In gleicher Weise wurde auch der Entquellungsgrad der Chloroplasten ( $G_{chl}$ ) bestimmt. Dieser ergibt sich aus dem Flächenverhältnis der unbeeinflussten Größe in Leitungswasser ( $F_{lw}$ ) zu der Größe im Plasmolytikum ( $F_{pl}$ ), d. h.  $G_{chl} = F_{pl} : F_{lw}$ . Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt, wobei der Plasmolyse- bzw. Entquellungsgrad auf der Ordinate und die Plasmolysezeit auf der Abszisse abgetragen wurden.

Um die Meßgenauigkeit der Methode festzustellen, wurden Messungen in schwach hypotonischer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung durchgeführt. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ( $F_m$ ) wurde nach der Formel  $F_m = \sqrt{\frac{\sum(f^2)}{n(n-1)}}$  bestimmt. Er betrug bei 30 Messungen  $\pm 0,5\%$ .

Als Plasmolytikum wurden Lösungen von Rohrzucker, der Chloride der Alkalimetalle und von  $\text{CaCl}_2$  in dest. Wasser verwendet. Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß nur eine schwache Plasmolyse eintrat. Sie lag im Durchschnitt um 0,13 mol. Rohrzucker über dem osmotischen Wert der Zelle. Bei kräftiger Plasmolyse rundet sich der Protoplast nämlich so stark ab, daß fast alle vorher parallel zur Oberfläche liegenden Chloroplasten seitlich gekippt werden und nicht mehr exakt gemessen werden können. Die Schnitte lagen in Deckelschälchen im Plasmolytikum und wurden nur zur Messung vorsichtig herausgenommen. Es wurde besonders darauf geachtet, daß das Deckglas die Zelle nicht preßte und dadurch eine Deplasmolyse vortäuschte.

#### a) Rohrzucker

Um die durch reine Plasmolysewirkung hervorgerufene Veränderung zu untersuchen, wurden Messungen in 0,6 mol. Rohrzucker durchgeführt.

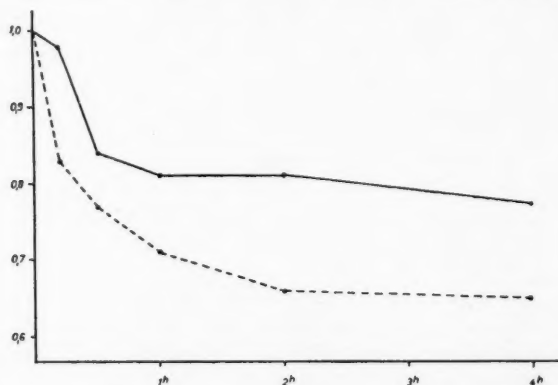


Abb. 1. Plasmolyseverlauf in 0,6 mol. Rohrzuckerlösung.  
Zelle: ----, Chloroplast: ———.

Parallel zum Plasmolysegrad der Zelle sank der Entquellungsgrad der Chloroplasten ab, wie aus der graphischen Darstellung (Abb. 1) klar ersichtlich ist.

Wurde eine Zelle nach einer Plasmolysezeit von einer Stunde wieder in Leitungswasser übertragen, so erreichen nach kurzer Zeit sowohl die Zelle als auch die Chloroplasten ihre ursprüngliche Größe wieder (Abb. 2).

Dehnt man die Plasmolysezeit auf mehrere Tage aus, so verhält sich der anfängliche Plasmolyseverlauf wie beschrieben. Der Plasmolysegrad der Zelle als auch der Entquellungsgrad der Chloroplasten erreichen schnell einen bestimmten Endwert. Dieser bleibt bei den Plastiden jedoch

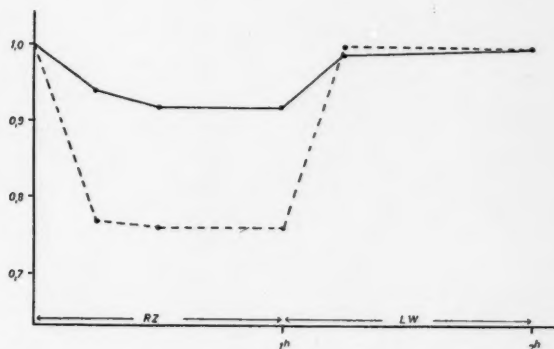


Abb. 2. Plasmolyse in 0,6 mol. Rohrzucker, nach 1 Std. Deplasmolyse der Zelle in Leitungswasser.

Zelle: —, Chloroplast: - - -.

nicht unbegrenzt erhalten. Nach ca. 12 Stunden setzt eine erneute Größenabnahme ein, die jetzt aber sehr langsam und kontinuierlich erfolgt. Während der Kurvenverlauf am Anfang eindeutig auf die Plasmolysewirkung zurückzuführen ist, handelt es sich bei der weiteren, kontinuierlichen Größenabnahme um eine allgemeine Degeneration der Chloroplasten, die durch den Aufenthalt der Zellen in wässrigen Medien hervorgerufen wird (Haberlandt 1902).

#### b) Calciumchlorid

Bei Plasmolyse mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen zeigte der Kurvenverlauf keine Unterschiede gegenüber dem in Rohrzuckerlösung. Nach einer deutlichen Größenabnahme bei Plasmolysebeginn trat keine weitere Veränderung mehr ein (Abb. 3).

Weiterhin wurde untersucht, ob bei steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration auch eine Steigerung der Größenabnahme der Chloroplasten festzustellen ist. Zu diesem Zwecke wurden Schnitte des gleichen Blattes mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen plasmolysiert, die von 0,10 mol. bis 0,40 mol. in Konzentrationsstufen von 0,05 mol. anstiegen. Die prozentuale Größenabnahme von Zelle und Chloroplasten wurde bestimmt und graphisch dargestellt, wobei auf der Abszisse die Konzentration der Lösung und auf der Ordinate die Prozente der Größenabnahme aufgetragen sind. Um einen besseren Vergleich

zwischen Zelle und Chloroplasten zu ermöglichen, wurden die Prozentwerte der Zelle auf ein Viertel verkleinert. Die Kurve (Abb. 4) zeigt, daß

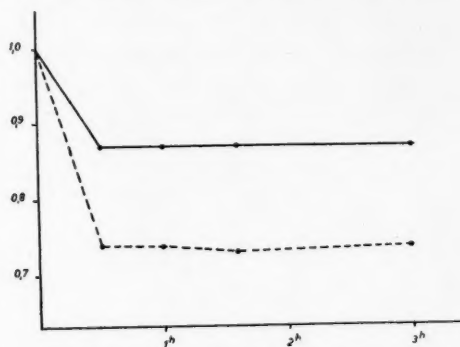


Abb. 3. Plasmolyse in 0,2 mol.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung.  
Zelle: ----, Chloroplast: —.

im hypotonischen Bereich keine Veränderungen eintreten, während im hypertotonischen Bereich Zelle und Chloroplasten proportional zum Kon-

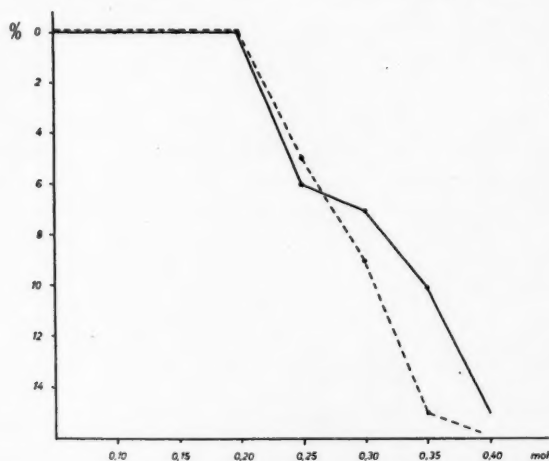


Abb. 4. Prozentuale Zunahme des Plasmolyse- bzw. Entquellungsgrades bei steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration. Die Prozentzahlen für die Zelle sind auf ein Viertel verkleinert.

Zelle: ----, Chloroplast: —.

zentrationenanstieg eine Größenabnahme erfahren (osmotischer Wert der Zelle 0,20 mol.  $\text{CaCl}_2$ ).

Wurde der Versuch dahingehend variiert, daß die gleiche Zelle in Ab-



ständen von 30 Minuten in die jeweils höhere Konzentration übertragen wurde, so zeigte sich das gleiche Ergebnis.

### c) Chloride der Alkalimetalle

Die mono- und bivalenten Metallionen lassen deutliche Unterschiede im Plasmolyseverhalten erkennen (Strugger 1949). Um zu prüfen, wie-

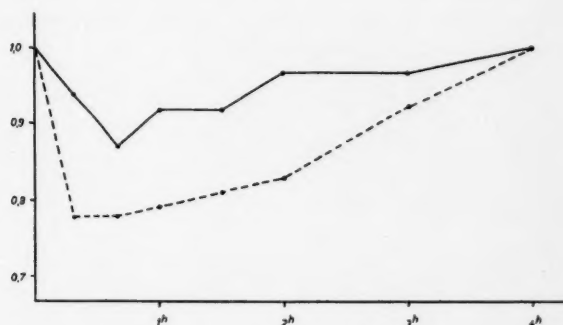


Abb. 5. Plasmolyse in 0,3 mol. KCl-Lösung. Die Deplasmolyse der Zelle und der Rückgang des Entquellungsgrades der Chloroplasten verläuft gleichsinnig.  
Zelle: -----, Chloroplast: —.

weit dies auch für die Größenänderung der Chloroplasten zutrifft, wurden neben den Experimenten mit Rohrzucker und Calciumchlorid auch Unter-

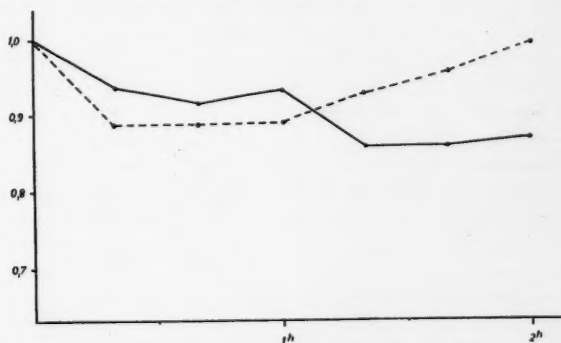


Abb. 6. Zelle in einer 0,3 mol. NaCl-Lösung. Der Plasmolyseverlauf der Chloroplasten (—) läßt nach 1 Std. eine Schädigung erkennen. Plasmolyse und Deplasmolyse der Zelle (-----) verlaufen dagegen unverändert.

suchungen mit den Chloriden der Alkalimetalle durchgeführt. Als Beispiel sei das Verhalten in einer 0,3 mol. KCl-Lösung beschrieben. Nach Erreichen des Endplasmolysegrades der Zelle setzt auf Grund einer Endosmose eine langsame Deplasmolyse ein, die nach 4 Stunden zu einem vollständi-

gen Plasmolyserückgang führte. Die Chloroplasten erreichten im gleichen Zeitraum ihre ursprüngliche Größe ebenfalls wieder (Abb. 5).

Bei Verwendung von NaCl, RbCl, CsCl oder LiCl als Plasmolytikum konnte nur in wenigen Fällen ein gleicher Plasmolyseverlauf wie in KCl-Lösung beobachtet werden. Die schädigende Wirkung dieser Ionen machte sich im Verhalten der Chloroplasten sehr stark bemerkbar. Als Beispiel sei hier der Plasmolyseverlauf in 0,3 mol. NaCl-Lösung angeführt (Abb. 6). Die Veränderungen des Protoplasten zeigten keine Abweichungen gegen-

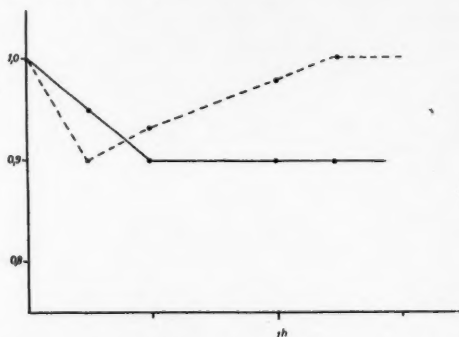


Abb. 7. Plasmolyse in 0,3 mol. RbCl-Lösung. Deplasmolyseverlauf der Zelle wie in NaCl-Lösung. Die Chloroplasten behalten ihren Entquellungsgrad unverändert bei. Zelle: -----, Chloroplast: ———.

über dem in KCl-Lösung beschriebenen Verhalten. Nach Erreichen eines Plasmolysemaximums setzt die Deplasmolyse ein, die nach 2 Stunden beendet ist. Im Gegensatz zum Protoplasten zeigten die Chloroplasten jedoch nur in der ersten Stunde das typische Plasmolyseverhalten. Nach 1 Stunde findet eine weitere Größenabnahme bis zu einem Endwert statt, der dann konstant beibehalten wird. Die Plasmaströmung ist sistiert, und die Chondriosomen haben sich abgekugelt. An den Chloroplasten selbst sind noch keine morphologischen Veränderungen zu beobachten.

Die schädigende Wirkung schwach hypertotonischer Lösungen von RbCl, CsCl und LiCl war noch stärker als bei NaCl ausgeprägt, so daß die Chloroplasten ihre Größe nach kurzer Zeit bis auf einen konstanten Endwert vermindert hatten (Abb. 7). Daher war ein Unterschied in der Wirkung dieser Salze untereinander nicht festzustellen.

#### d) Mischlösungen

Nach der Untersuchung der Wirkung reiner Lösungen war eine Analyse der Größenänderungen in gemischten Salzlösungen von besonderem Interesse. Zu diesem Zwecke wurden KCl- und CaCl<sub>2</sub>-Lösungen in verschiedenen prozentualen Verhältnissen gemischt. Um dabei stets einen konstanten osmotischen Wert zu behalten, mußten die Lösungen unter Beachtung der isotonischen Koeffizienten (i) der Salze hergestellt werden.

Die entsprechenden  $i$ -Werte wurden der Arbeit von Fitting (1917) entnommen. Sie betrugen für KCl = 1,685 und für  $\text{CaCl}_2$  = 2,37. Demnach entspricht einer 0,3 mol. KCl-Lösung eine 0,195 mol.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung. Von

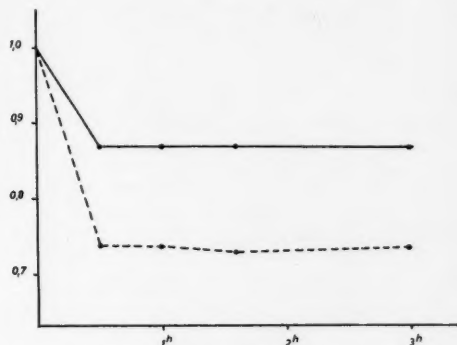


Abb. 8. 100%  $\text{CaCl}_2$ .  
Zelle: ----, Chloroplast: —.

einer reinen 0,195 mol.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ausgehend, wurde durch Zugabe von steigenden Mengen einer 0,3 mol. KCl-Lösung das prozentuale Verhältnis zugunsten des Kaliumchlorids bis zur Erreichung einer reinen KCl-Lösung

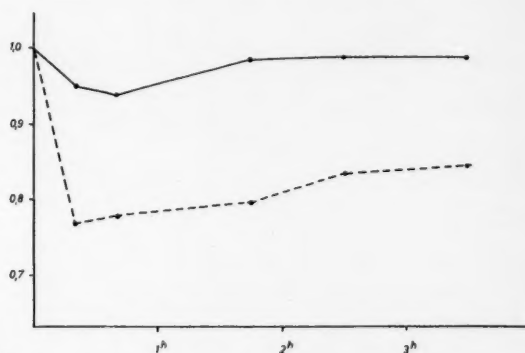


Abb. 9. 90%  $\text{CaCl}_2$  + 10% KCl.  
Zelle: ----, Chloroplast: —.

stetig verändert. An fünf Konzentrationsstufen sei das Verhalten beschrieben, die Zwischenwerte ordnen sich harmonisch in die Reihe ein.

#### 1. 100 % $\text{CaCl}_2$

Plasmolysegrad der Zelle und Entquellungsgrad der Plastiden sinken auf einen bestimmten Wert ab und behalten diesen unverändert bei (Abb. 8).

## 2. 90 % $\text{CaCl}_2$ + 10 % $\text{KCl}$

Die Zelle zeigt schwache Deplasmolyse. Die Chloroplasten vermindern

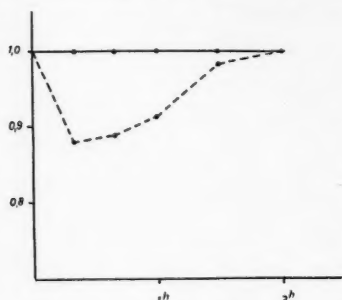


Abb. 10. 50%  $\text{CaCl}_2$  + 50%  $\text{KCl}$ .  
Zelle: ----, Chloroplast: ———.

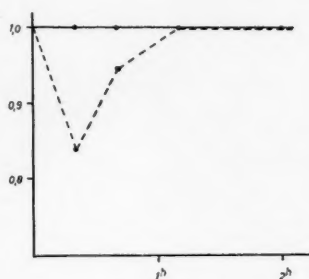


Abb. 11. 1%  $\text{CaCl}_2$  + 99%  $\text{KCl}$ .  
Zelle: ----, Chloroplast: ———.

ihre Größe dagegen nur wenig und haben nach kurzer Zeit ihre Ausgangsgröße wieder erreicht (Abb. 9).

## 3. 50 % $\text{CaCl}_2$ + 50 % $\text{KCl}$

Die Deplasmolyse der Zelle verläuft jetzt schneller und ist nach 2 Stunden beendet. Die Chloroplasten verändern ihre Größe während der Dauer des Versuches nicht (Abb. 10).

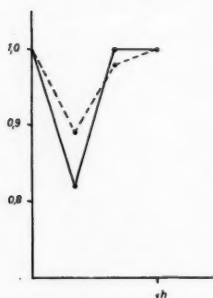


Abb. 12. 100%  $\text{KCl}$ .  
Zelle: ----, Chloroplast: ———.

## 4. 1 % $\text{CaCl}_2$ + 99 % $\text{KCl}$

Durch den höheren Gehalt der Lösung an  $\text{K}^+$ -Ionen verläuft die Deplasmolyse der Zelle noch schneller. Die Chloroplasten zeigen auch in dieser Lösung keinerlei Größenänderung (Abb. 11).

## 5. 100 % $\text{KCl}$

Die Chloroplasten verändern ihre Größe parallel zum Plasmolyse- und Deplasmolyseverlauf der Zelle (Abb. 12).

Sowohl in der reinen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung als auch in der reinen  $\text{KCl}$ -Lösung verändern die Chloroplasten ihre Größe in direkter Abhängigkeit vom Plasmolysegrad der Zelle. In der Mischlösung genügt jedoch schon ein  $\text{CaCl}_2/\text{KCl}$ -Verhältnis von 1 : 99, um eine Größenänderung der Chloroplasten bei Plasmolyse zu verhindern.

## D. Strukturänderungen der Chloroplasten in wässrigen Medien

Neben der beschriebenen Größenänderung konnten charakteristische Strukturänderungen der Chloroplasten während des Aufenthaltes der Zellen in wässrigen Medien beobachtet werden.

Untersucht wurde die Wirkung von Rohrzucker,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KNO}_3$  und  $\text{KSCN}$  in Konzentrationsstufen von 0,05 mol.

Da es sich zeigte, daß die Art der Strukturänderung von der Art der verwendeten Stoffe unabhängig war, sei hier als Beispiel das Verhalten in einer dem osmotischen Wert der Zelle isotonischen KCl-Lösung (0,3 mol) beschrieben.

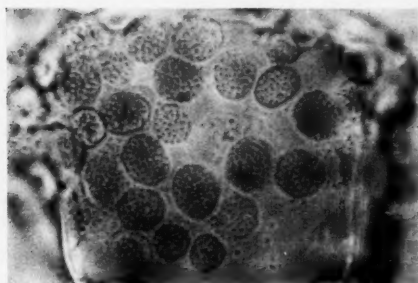


Abb. 13. Zelle unmittelbar nach Überführung des Schnittes in 0,3 mol. KCl. Die Granastruktur ist geordnet, alle Grana treten gleichmäßig stark hervor. Vergr. 900  $\times$ .

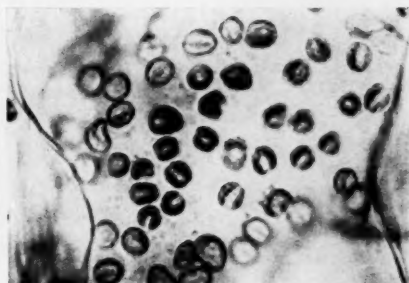


Abb. 14. Typische Näpfchenbildung bei Flächen- und Profilstellung der Chloroplasten. Näheres siehe Text. Vergr. 900  $\times$ .

1. Unmittelbar nach dem Einwirken der Lösung auf die Zelle werden die Grana dunkler und heben sich in ihrer Farbintensität deutlich vom Stroma ab. Die Zelle besitzt noch ihre volle Vitalität (Abb. 13).

2. Nach ca. 3 Stunden setzt ziemlich spontan eine Näpfchenbildung ein. Die Chloroplasten biegen sich dabei halbmondförmig ein (Abb. 14). Die

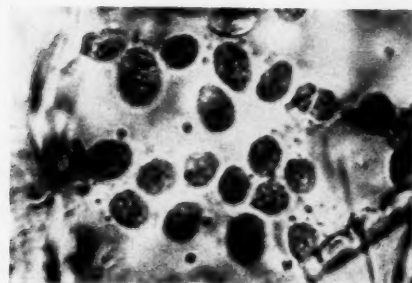


Abb. 15. Flächenstellung der Plastiden. Einzelne Grana treten stark hervor und vereinigen sich. Vergr. 1800  $\times$ .

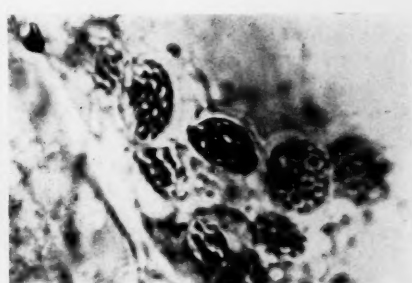


Abb. 16. Profilstellung der Plastiden. Die Streifen werden parallel zur Oberfläche ausgebildet. Vergr. 1800  $\times$ .

Öffnung ist anfangs von einer schwach nach außen gewölbten Membran verschlossen. Diese platzt jedoch bald, wobei sich der Chloroplast zwar etwas streckt, aber als nunmehr offenes Näpfchen zurückbleibt. Die Zelle ist irreversibel geschädigt, die Strömung sistiert, die Chondriosomen haben sich abgekugelt.

3. Zur gleichen Zeit setzt die Streifenbildung ein. In der Flächenansicht kann man dabei beobachten, daß einzelne Grana besonders deutlich hervortreten und größer werden. Allmählich vereinigen sich diese, so daß eine

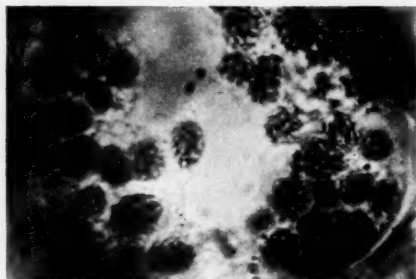


Abb. 17. Die streifigen Chloroplasten verkleben zu einer grünen Masse, zum Teil vakuole Verquellung von Cytoplasma und Plastiden. Vergr. 1000  $\times$ .

unregelmäßige Streifung eintritt (Abb. 15). In der Profilansicht verschwindet die Geldrollenstruktur und wird von Streifen, die vornehmlich parallel zur Oberfläche liegen, abgelöst (Abb. 16).

4. Die Plastiden verlieren ihre feste Begrenzung und verkleben unter Quellungserscheinungen zu einer einheitlichen, hellgrünen Masse, in der die Streifen und vereinzelte Grana dunkel hervortreten. Die Plastidensubstanz und das dazwischen liegende Plasma verfällt einer vakuoligen Degeneration (Abb. 17).

Während der Reaktionsverlauf bei Verwendung der verschiedenen Stoffe keine bedeutenden Unterschiede zeigte, war der Zeitraum bis zum Beginn der Reaktion sehr unterschiedlich. Als Reaktionsbeginn kann man dabei allerdings erst das Einsetzen der Näpfchen- und Streifenbildung werten, da ein Dunklerwerden der Grana in jedem Medium nach kurzer Zeit eintritt. Vergleicht man isotonische Lösungen der untersuchten Stoffe hinsichtlich der Geschwindigkeit ihrer Wirkung auf die Chloroplasten, so ordnen sie sich im wesentlichen nach dem Grad ihrer Giftigkeit für die Zelle an ( $\text{Rohrzucker} < \text{CaCl}_2 < \text{KCl}$ ,  $\text{NaCl} < \text{KNO}_3 < \text{KSCN} < \text{LiCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ,  $\text{CsCl}$ ).

Ein Unterschied konnte jedoch in der Wirkung der verschiedenen Konzentrationen beobachtet werden. Waren die Lösungen gegenüber dem osmotischen Wert der Zellen stark hypertonisch, so trat die vakuolige Verquellung nicht ein, die Chloroplasten behielten die Näpfchenform und Streifung unverändert bei. In hypotonischen Medien konnte teilweise der Übergang von dem mit einem Häutchen verschlossenen Näpfchen zum steifig verquellenden Chloroplasten anders verlaufen. Die anfangs kleine Vakuole in der Höhlung

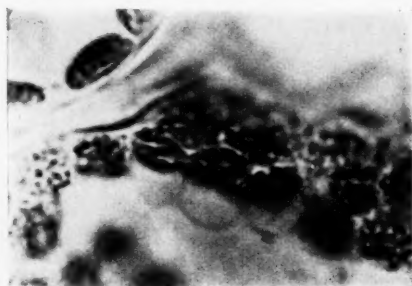


Abb. 18. Flächenschnitt in hypotonischer Lösung. Chloroplasten mit Streifen und angeschwollenen Vakuolen. Vergr. 1800  $\times$ .

des Nüpfchens beginnt zu schwellen. Dabei streckt sich der Chloroplast innerhalb der Vakuole wieder und wird streifig (Abb. 18).

### **E. Diskussion der Ergebnisse**

#### **a) Größenänderung der Chloroplasten**

Die angewandte Methode gestattet es, an den Chloroplasten höherer Pflanzen quantitativ gesicherte Größenänderungen festzustellen. Bei Verwendung reiner Lösungen verändern die Chloroplasten ihre Größe parallel zum Plasmolyse- und Deplasmolyseverlauf der Zelle. Dieses Verhalten entspricht den Vorstellungen von der entquellenden Wirkung hypertotonischer Lösungen auf das Cytoplasma und seine Einschlüsse (Walter 1923). Ein davon völlig abweichendes Ergebnis erbrachten jedoch die Plasmolyseversuche mit  $\text{CaCl}_2/\text{KCl}$ -Mischlösungen. Trotz der klaren Änderung des Plasmolysegrades der Zelle behielten die Chloroplasten ihre ursprüngliche Größe unverändert bei. Eine Erklärung für diese Größenkonstanz der Chloroplasten während der Plasmolyse kann nicht gegeben werden.

In diesem Zusammenhang scheint jedoch ein Hinweis auf die „schonende Plasmolyse“ durch „äquilibrierte Lösungen“ von Bedeutung. Während Höfler (1939) eine Hemmung der Kappenbildung durch einen Calciumzusatz zu Kaliumionen erreichte, d. h. also eine Hemmung der Quellung, wird in der vorliegenden Arbeit die Hemmung der Entquellung durch Mischlösungen beobachtet. Eine rein antagonistische Ionenwirkung nach dem Prinzip der gegenseitigen Aufhebung von Quellung und Entquellung kann jedoch nicht vorliegen, da ja jedes Salz der Mischlösung allein eine Größenabnahme hervorruft.

Da man die Chloroplasten auf Grund der vorliegenden Ergebnisse als „Indikatoren“ für Änderungen des Quellungszustandes im Binnenplasma betrachten kann, scheint die Methode für Untersuchungen der Frage des Ionenantagonismus und der Ioneninetrabilität geeignet zu sein.

#### **b) Strukturänderung der Chloroplasten**

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigten, ließ sich eine spezifische Wirkung der einzelnen Salze auf die Chloroplasten nicht beobachten. Man konnte vielmehr bei allen Salzen einen ähnlichen Verlauf der Strukturänderung erkennen, der lediglich bei den verschiedenen Stoffen nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer einsetzte. Zwei Gründe scheinen für die Einförmigkeit im Verhalten der Chloroplasten vorzuliegen. Bei dem als erste Stufe beschriebenen deutlichen Hervortreten der Granastruktur handelt es sich wahrscheinlich um eine unterschiedliche Quellung des proteinreichen Stromas und der lipoidreichen Grana, die durch das Übertragen des Schnittes in jedes wässrige Medium hervorgerufen wird. Die darauf folgenden Veränderungen der Chloroplasten sind irreversible Schädigungen und ordnen sich in den Nekroseverlauf des gesamten Protoplasten ein. Wahrscheinlich wirken die Salze primär auf das Cytoplasma ein, und die durch Schädigung der geordneten Plasmastruktur frei werdenden



biologisch aktiven Substanzen verändern dann sekundär die Chloroplasten.

Bei der Streifenbildung der Chloroplasten könnte es sich um eine lipoiden Degeneration handeln. Die Grana bestehen aus einem Lipoprotein, von dem man annehmen darf, daß die Bindung des Lipoids an das Protein locker ist (Frey-Wyssling und Steinmann 1953). Bei der Erklärung dieses von der französischen Schule Guillermonds als Lipophaneroze bezeichneten Vorgangs erwähnt schon Beauverie (1928) die Bedeutung osmotischer Wirkungen, welche das in den Plastiden herrschende Gleichgewicht stören. Bei dem Degenerationsvorgang wird wahrscheinlich die Lipoidkomponente frei. Die Vereinigung der Lipoiden mehrerer Grana scheint innerhalb der Stromalamellen (Strugger 1947, Steinmann 1952, Cohen und Bowler 1953) zu verlaufen. Nur so läßt sich erklären, daß die Streifung in der Profilstellung der Chloroplasten ziemlich parallel, in der Aufsicht dagegen ungerichtet verläuft.

Die vor oder gemeinsam mit der Streifenbildung auftretende Näpfchenbildung der Chloroplasten ist schon von Küster (1937) beobachtet und von Schmidt (1951) experimentell hervorgerufen worden. Beide erklären die Entstehung der Näpfchenformen durch unterschiedliche Quellung innerhalb des Chloroplasten. Schmidt nimmt in diesem Zusammenhang an, daß ein morphologischer Unterschied zwischen der Ober- und Unterseite des Chloroplasten besteht. Die elektronenoptischen Untersuchungen an Plastiden (Literatur s. Frey-Wyssling 1953) ließen einen solchen jedoch nicht erkennen. Bei meinen Untersuchungen an isolierten Chloroplasten (Mudrack 1956) konnte das Auftreten von Näpfchenformen in Rohrzuckerlösungen beobachtet werden, die gegenüber dem osmotischen Wert innerhalb des isolierten Chloroplasten hypertonisch waren. Diese Erscheinung konnte so erklärt werden, daß der Chloroplast durch Permeabilitätsminderung der Plastidengrenzfläche zum osmotisch beeinflussbaren System wird. Das Chloroplasteninnere scheidet sich dabei, analog der von Strugger (1929 a, b; 1950; 1952) beobachteten Veränderung isolierter Zellkerne, in einen Gelteil und einen Solteil. Im hypertonischen Medium schrumpft die Solblase und zwingt dabei dem Gelteil eine Näpfchenform auf. Die Solblase kann nach einiger Zeit platzen, so daß dann ein nunmehr offenes Näpfchen zurückbleibt.

Da zu vermuten war, daß auch in der Zelle die Näpfchenbildung nach dem gleichen Modus verlaufen könnte, wurde diese einer erneuten Analyse unterzogen. Dabei zeigte es sich, daß stets in der ersten Phase Näpfchen mit einer Membran auftreten (Abb. 19). Die Membran platzt jedoch meist nach kurzer Zeit. Da die Chloroplasten noch im Cytoplasma eingebettet waren, konnten sich die Gelteile nicht wieder völlig strecken und bildeten jetzt die typischen Näpfchen. Weiterhin wurden Näpfchenformen nach Schmidt (1951) mit dem „Pyrenderivat 949“ (Bayer, Leverkusen) experimentell erzeugt. Schnitte der Blattunterseite von *Viola tricolor* f. *maxima* wurden auf einer wässrigen Lösung des „Pyrenderivats 949“ (1 : 1 000 000) schwimmend behandelt. Nach sechs Tagen bildeten die Chloroplasten

Näpfchen mit deutlich sichtbarer Membran (Abb. 20). Die Zellen zeigten noch lebhafte Plasmaströmung, die Chloroplasten der unbeeinflussten Zellen waren unverändert.

Auf Grund meiner Untersuchungen halte ich eine Entstehung der Näpfchenformen der Chloroplasten durch unterschiedliche Quellung für unwahrscheinlich. Ich glaube vielmehr, daß die Näpfchenbildung in der Zelle nach dem gleichen Modus wie bei den isolierten Chloroplasten verläuft. Es ent-



Abb. 19. *Agapanthus umbellatus*. Zelle 17 Std. in 0,2 mol. KCl-Lösung. Näpfchen mit deutlicher Membran. Vergr. 1800  $\times$ .



Abb. 20. *Viola tricolor*. Lebende Zelle 6 Tg. mit „Pyrenderivat 949“ (1 : 1 000 000) behandelt. Chloroplast bildet Näpfchen mit Membran. Vergr. 1500  $\times$ .

stehen in jedem Falle zuerst Näpfchen mit einer geschlossenen Membran, die jedoch sehr bald platzen kann, so daß die Chloroplasten als offene Näpfchen zurückbleiben.

Das als Endphase beschriebene schaumige Verquellen ist ein für das Cytoplasma und seine Einschlüsse typisches Nekrosebild (Küster 1951, Perner 1954). Daß diese letzte Stufe der Veränderungen im hypertoni-schen Medium oft ausbleibt, könnte in der osmotischen Wirksamkeit des-selben begründet sein.

## F. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Größenänderungen der Chloroplasten bei Plasmolyse und Deplasmolyse der Zelle wurden gemessen.

a) Bei Verwendung reiner Zucker- oder Salzlösungen veränderte sich die Größe der Plastiden parallel zum Plasmolyse- bzw. Deplasmolysegrad der Zelle.

b) Nach völliger Deplasmolyse der Zelle hatten auch die Chloroplasten ihre ursprüngliche Größe wieder erreicht.

c) Bei Verwendung von  $\text{CaCl}_2/\text{KCl}$ -Mischlösungen als Plasmolytikum veränderten die Chloroplasten ihre Größe während der Plasmolyse und Deplasmolyse der Zelle nicht.

2. Die Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Rohrzucker, LiCl, NaCl, KCl, RbCl, CsCl, CaCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub> und KSCN auf die Struktur der Chloroplasten in der Zelle wird untersucht. Es treten folgende Veränderungen in bestimmter Reihenfolge auf:

- a) Die Grana treten deutlich hervor.
- b) Der Chloroplast bildet ein Näpfchen, dessen Höhlung mit einer Membran verschlossen ist, und wird streifig.
- c) Die Membran platzt, die Chloroplasten verkleben miteinander und verquellen schließlich.

3. Die einzelnen Stoffe unterscheiden sich in ihrer Wirkung nur durch die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit der Chloroplasten. Dabei ordnen sie sich nach ihrer Giftwirkung auf die Zelle an (Rohrzucker < CaCl<sub>2</sub> < KCl, NaCl, KNO<sub>3</sub>, KSCN < LiCl, RbCl, CsCl).

4. Die Entstehung der Näpfchenformen wird als die Folge einer Permeabilitätsminderung der Chloroplastenoberfläche und der osmotischen Aktivität des Außenmediums gedeutet. Die Entstehung durch unterschiedliche Quellung (Küster 1937) konnte nicht bestätigt werden.

#### Literatur

- Abele, K., 1951: Über die Volumenabnahme des Zellkernes in der Plasmolyse und über das Zustandekommen der Kernplasmarelation. *Protoplasma* 40, 524.
- Beauverie, J., 1928: Quelques aspects de la dégénérescence des plastes; applications au parasitisme. *Rev. gén. bot.* 40, 206.
- Cholnoky, B. v., 1955: Plasmolyse und Lebendfärbung bei *Melosira*. *Protoplasma* 22, 161.
- Cohen, M., and E. Bowler, 1955: Lamellar structure of the Tobacco chloroplast. *Protoplasma* 42, 414.
- Eibl, K., 1959: Studien über das Plasmolyseverhalten der Desmidiaceen-Chromatophoren. *Protoplasma* 33, 551.
- Fitting, H., 1917: Untersuchungen über isotonische Koeffizienten und ihren Nutzen für Permeabilitätsbestimmungen. *Jb. wiss. Bot.* 57, 553.
- Frey-Wyssling, A., 1953: Submicroscopic Morphology of Protoplasm. Amsterdam.
- und E. Steinmann, 1955: Ergebnisse der Feinbau-Analyse der Chloroplasten. *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* 98, 20.
- Gieklhorn, J., 1955: Über aktive Chloroplasten-Kontraktion bei *Spirogyra* und den Aggregatzustand der Spiralbänder. *Protoplasma* 17, 571.
- Göppert, H. R., und F. Cohn, 1849: Über die Rotation des Zellinhaltes in *Nitella flexilis*. *Bot. Zeitg.* 7, 665.
- Haberlandt, G., 1902: Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. I*, 111, 69.
- Höfler, K., 1918: Eine plasmolytisch-volumetrische Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Pflanzenzellen. *Denkschr. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl.* 95, 99.
- 1959: Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. *Protoplasma* 33, 545.
- Küster, E., 1937: Pathologie der Plastiden. *Protoplasma-Monographien* 15. Berlin.
- 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Aufl. Jena.

- Mudrack, K., 1956: Experimentelle Untersuchungen an isolierten Chloroplasten. *Protoplasma* 46, 556.
- Nägeli, C. v., 1846: Bläschenförmige Gebilde im Inhalt der Pflanzenzelle. *Z. wiss. Bot.*, 3.—4. Heft.
- Osterhout, W. J. V., 1946 a: Water relations in the Cell I. The chloroplasts of *Nitella* and of *Spirogyra*. *J. gen. Physiol. (Am.)* 29, 73.
- 1946 b: Some properties of protoplasmic gels I. Tension in the chloroplasts of *Spirogyra*. *J. gen. Physiol. (Am.)* 29, 181.
- 1947: Some properties of protoplasmic gels II. Contraction of chloroplasts in currents of water entering the cells and expansion in outgoing currents. *J. gen. Physiol. (Am.)* 30, 229.
- 1948: Anormal protoplasmic patterns and death in slightly hypertonic solutions. *J. gen. Physiol. (Am.)* 31, 291.
- Perner, E. S., 1954: Untersuchungen über die Chondriosomen und Sphärosomen in Pflanzenzellen. Habilitationsschrift Univ. Münster.
- Schmidt, H.-H., 1951: Studien zur experimentellen Pathologie der Chloroplasten II. Untersuchungen über die Streifen- und Näpfchenbildung der Chloroplasten. *Protoplasma* 40, 507.
- Senn, G., 1908: Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzenchromatophoren. Engelmann, Leipzig.
- Steinmann, E., An electron microscope study of the lamellar structure of chloroplasts. *Exper. Cell Res.* 3, 367.
- Strugger, S., 1929 a: Untersuchungen an isolierten Kernen der Internodialzellen von *Chara fragilis* Desv. *Planta* 8, 717.
- 1929 b: Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmung an Characeen III. Beobachtungen am ausgeflossenen Protoplasma durchschnittener *Chara*-Internodialzellen. *Protoplasma* 7, 23.
- 1930: Beitrag zur Kolloidchemie des pflanzlichen Ruhekernes. *Protoplasma* 10, 365.
- 1932: Über Plasmolyse mit Kaliumrhodanid. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 50, 24.
- 1947: Die Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. *Z. Naturforsch.* 2 b, 146.
- 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Springer-Verlag, Berlin 1949.
- Vries, H. de, 1889: Über die Kontraktion der Chlorophyllbänder bei *Spirogyra*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 7, 19.
- Walter, H., 1923: Protoplasma- und Membranquellung bei Plasmolyse. *Jb. wiss. Bot.* 62, 145.

# Die Impulsrichtungsänderungen bei der Induktion der Protoplasmaströmung

Von

**Robert Jarosch**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. April 1956)

## Einleitung

Frank erkannte 1872, daß in vielen Pflanzenzellen die Protoplasmaströmung erst durch äußere Einflüsse entsteht. Diese „induzierte“ oder „sekundäre“ Strömung wurde von der „spontanen“ oder „primären“ unterschieden, wie sie bei den Characeen und in den meisten Haarzellen vorkommt (Hauptfleisch 1892). Auf Grund der neuen Arbeitsrichtung, welche sich die Analyse der strömungsauslösenden Reize zum Ziel gesetzt hatte, fand man Verletzungen, Beleuchtungsänderungen, Temperatursprünge und chemische Einflüsse als strömungsauslösend. Fitting (1925—1937) konnte schließlich nach langwierigen Versuchen in bestimmten Aminosäuren diejenigen Stoffe erkennen, welche die Strömung bei *Vallisneria* auch noch in sehr großen Verdünnungen auszulösen imstande waren („Chemodinese“).

Bei allen Untersuchungen, die sich mit der Strömungsauslösung beschäftigten, wurde immer eine gewisse Zeitspanne beobachtet, die nach der Reizsetzung verstreichen muß, ehe es zur Strömung kommt. Sofort nach der Präparation z. B. eines *Elodea*-Blattes ist die Strömung noch nicht sichtbar, sondern sie entsteht erst langsam nach etwa 5 bis 10 Minuten. Als Vorstadium der Strömung wurde in dieser Zeitspanne von Dehneke (1881), Wigand (1885), Hauptfleisch (1892) u. a. eine regellose Mikrosomenbewegung beschrieben und mit einem schon von Nägeli (1853) für unregelmäßige Mikrosomenbewegungen verwendeten Ausdruck als „Glitschbewegung“ bezeichnet. Wigand sprach von „Digressionsbewegung“.

Die vorliegende Arbeit versucht nun an der Innenepidermis von *Allium cepa*, einem für die Beobachtung der Mikrosomenbewegung sehr geeigneten

Objekt, die Veränderungen der Glitschbewegung und die Ausbildung der Strömung genauer zu verfolgen.

### Methodik

Es wurde die leicht ablösbare Innenepidermis von *Allium cepa* im Hellfeld untersucht (Ölimmersionsobjektiv 90 $\times$ , Okular 10 $\times$ , Tubus auf 20 cm ausgezogen). Dabei war das obere oder untere wandständige Plasma einer Zelle eingestellt, so daß im Blickfeld keine senkrechte Zellwand die horizontale Bewegungsmöglichkeit des Plasmas beschränkte.

Die Bahnen der meist gleich großen Sphärosomen konnten mittels eines Abbéschen Zeichenapparates nachgezeichnet werden, in der Weise, daß alle 3 oder 1,5 Sekunden der augenblickliche Ort eines Teilchens durch einen Punkt fixiert und durch eine gerade Linie mit dem nächsten Punkt verbunden wurde. Diese „Punktierungsmethode“ ist bei der Untersuchung der Brownschen Bewegung üblich. Das Zeitintervall war an einer auf der Zeichenfläche liegenden Stoppuhr ersichtlich (eine Zeigerumdrehung: 3 Sekunden). Das bezeichnete Papierblatt wurde je nach Bedarf seitenparallel verschoben, damit die verschiedenen Teilchenbahnen sich nicht überlagern konnten. Von den vielen sichtbaren Teilchen wurden die auffälligst bewegten verfolgt.

Es bestand die Aufgabe, die graphisch fixierte Bewegung zahlenmäßig auszudrücken. Das ist auf folgende Weise geschehen.

Die Einstein-Smoluchowskische Formel der Brownschen Bewegung zeigt Proportionalität zwischen mittlerem Verschiebungsquadrat  $(\Delta x)^2$  und Zeitintervall  $i$ :

$$(\Delta x)^2 = \frac{k T i}{3 \eta r}.$$

Diese Proportionalität, die hier allein von Interesse ist, gilt für jede völlig unregelmäßige Bewegung. Bei der Brownschen Bewegung wurde sie bestätigt und auch bei der Bakterien- und Protozoenbewegung gültig gefunden, wenn nicht in zu kleinen Zeitabständen punktiert wird (vgl. Polster 1949).

Es ist also

$$2(\Delta x)^2 = \frac{k T 2 i}{3 \eta r}$$

und daher

$$\frac{\frac{k T 2 i}{3 \eta r}}{\frac{k T i}{3 \eta r}} = 2.$$

Bei einer ungeordneten, unregelmäßigen Bewegung wie der Brownschen ist also der Quotient aus mittlerem Verschiebungsquadrat des doppelten Zeitintervalls durch mittleres Verschiebungsquadrat des einfachen Zeitinter-

valls gleich 2. Im Gegensatz dazu ist bei einer vollkommen gerichteten regelmäßigen Bewegung das mittlere Verschiebungsquadrat des einfachen Zeitintervalls genau viermal im mittleren Verschiebungsquadrat des doppelten Zeitintervalls enthalten (vgl. Abb. 1 b). Es können daher alle Bewegungsübergänge von ganz unregelmäßig bis vollkommen regelmäßig in Zahlen von 2,00 bis 4,00 ausgedrückt werden.

Abb. 1 zeigt eine anschauliche Darstellung dieser Bewegungsverhältnisse. a stellt eine völlig ungeordnete, unregelmäßige Bewegung dar. Die in allen Richtungen wirkenden Impulse können als zwei aufeinander senkrecht stehende Katheten aufgefaßt werden. Das Verschiebungsquadrat des einfachen

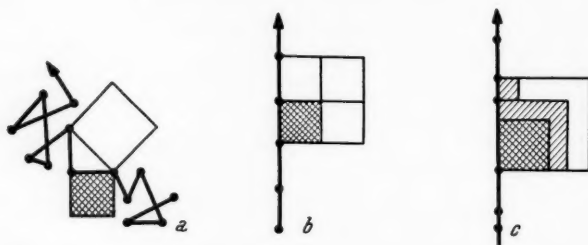


Abb. 1. Graphische Darstellung der durchschnittlichen Verschiebungsquadrate. a bei einer völlig unregelmäßigen Bewegung wie der Brownschen ( $Q_r$  = Weißes Quadrat/doppelt schraffiertes Quadrat = 2,0), b bei einer ganz regelmäßigen Bewegung ( $Q_r$  = 4,0), c bei einer gerichteten, aber ungleichmäßigen Geschwindigkeit zeigenden Bewegung ( $Q_r$  = < 4,0).

Zeitintervalls (doppelt schraffiertes Quadrat) ist im Verschiebungsquadrat des doppelten (weißes Quadrat) zweimal enthalten (Pythagoreischer Lehrsatz). Der Regelmäßigkeitsquotient  $Q_r$  ist 2,00. b zeigt eine vollkommen regelmäßige Bewegung. Das Verschiebungsquadrat des einfachen Zeitintervalls ist im Verschiebungsquadrat des doppelten viermal enthalten,  $Q_r$  = 4,00. c veranschaulicht eine zwar gerichtete, aber ungleichmäßige Bewegung (verschiedene Geschwindigkeiten). Das mittlere Verschiebungsquadrat des einfachen Intervalls (Mittel aus den beiden einfach schraffierten Quadraten = doppelt schraffiertes Quadrat) muß hier größer sein als ein Viertel des Verschiebungsquadrates des doppelten Intervalls und kann daher nur weniger als viermal im weißen Quadrat enthalten sein.  $Q_r$  ist hier also kleiner als 4,00.

Würde an Stelle des Verschiebungsquadrates nur die Verschiebung berücksichtigt werden, so bekämen wir Quotienten von  $\sqrt{2}$  bis 2. Diese „Orientierungsquotienten“ würden aber bei b und c (Abb. 1) gleich groß sein, und diese Bewegungen wären zahlenmäßig nicht zu unterscheiden. Deshalb ist der „Regelmäßigkeitsquotient“  $Q_r$  vorzuziehen, da er Orientierung der Impulsrichtung und Gleichmäßigkeit der Geschwindigkeit ausdrückt. Seine Berechnung ist allerdings etwas umständlicher.

Für die Plasmabewegung bedeutet  $Q_r$  = 4,00 also ganz regelmäßige,



rotationsartige Strömung. Verkleinernd auf  $Q$ , wirken 1. Unorientiertheit der Bewegungsimpulse und 2. ungleichmäßige Geschwindigkeiten.

Da die Protoplasmabewegung viel regelmäßiger ist als die Brownsche, genügt hier für die Bestimmung der Verschiebungsquadrate eine kleinere Anzahl von Messungen (Punkte) als bei der BMB. Es wurden durchschnittlich gegen 100 für die Berechnung eines Quotienten verwendet. Unter 50 erfolgte keine Auswertung.

Zu  $Q$ , gelangt man auf folgende Weise. Zuerst wurden die einzelnen getrennten Bahnen numeriert. Dann erfolgte die Bestimmung der Verschiebung des einfachen Zeitintervalls von Punkt zu Punkt (Messung in Millimetern mittels Maßstabes). Jeder einzelne Wert wurde quadriert und aus allen das arithmetische Mittel gezogen. Ähnlich wurde der Wert des mittleren Verschiebungsquadrates des doppelten Zeitintervalls bestimmt, wobei der Abstand jedes zweiten Punktes zu messen war, zuerst vom ersten Punkt einer Bahn begonnen und dann vom zweiten. Den Regelmäßigkeitsquotienten erhielt man schließlich durch Division der beiden mittleren Verschiebungsquadrate.

### Beschreibung der Plasmabewegung

Die Sphärosomen sind bei *Allium cepa* nicht sehr dicht und ihre Geschwindigkeit ist relativ gering, bei regelmäßiger Bewegung im Durchschnitt etwa  $4 \mu/\text{sec}$ . So bereitet ihre Verfolgung keine Schwierigkeiten.

Häufig erfolgte in den Präparaten eine Ansammlung der Sphärosomen im unteren Teil der Zelle. Die der oberen Zellwand anliegende Plasmanschicht verarmte dabei an Teilchen. Diese ungleiche Verteilung trat auch im Dunkeln ein und ist wohl durch die Schwerkraft verursacht.

Die Plasmaströmung war meist eine induzierte (die Zwiebeln lagerten bei gleichmäßiger Temperatur und im Finstern). Ungefähr 5 Minuten nach der Präparation begann die Bewegung. Sie wurde auch im Dunkeln ausgelöst. Bei allen untersuchten Bewegungen waren die Epidermisstückchen ohne vorherige Entlüftung in Leitungswasser präpariert.

Während ältere Zellen im Präparat oft tagelang weiterströmten, beruhigten sich jüngere Zellen meist sehr bald (Schädigung?) und ließen dann keine deutliche Strömung mehr erkennen. Aus diesem Grunde konnte der neuerliche Beginn einer gänzlich beruhigten Strömung niemals verfolgt werden. Dagegen beschleunigte sich nach wenigen Sekunden häufig eine langsam gewordene Strömung, wenn am nächsten Tag z. B. ein Tropfen des schon zur Präparation verwendeten Leitungswassers zugesetzt wurde.

Interessant ist der Bewegungsbeginn. Die Sphärosomen, die oft langsame Glitschbewegungen oder schwache BMB zeigen, beginnen plötzlich ruckartige Bewegungen in den verschiedensten Richtungen auszuführen. Diese Bewegungen sind sehr ungleichmäßig, und man kann nie vorher sagen, welches Teilchen jetzt eine größere Strecke zurücklegen und welche Richtung dabei eingeschlagen werden wird. Es ist auch kaum möglich, den Bewegungsbeginn zeitlich genau festzulegen. Die Teilchen zeigen oft wieder BMB, nachdem sie sich schon in größeren Bereichen bewegt haben. Nicht

selten, besonders bei den kleineren Zellen, hört die Bewegung in diesem Stadium bereits wieder auf. Meist aber verstärken sich die Glitschbewegungen in kurzer Zeit, immer mehr Teilchen werden erfaßt, und schließlich

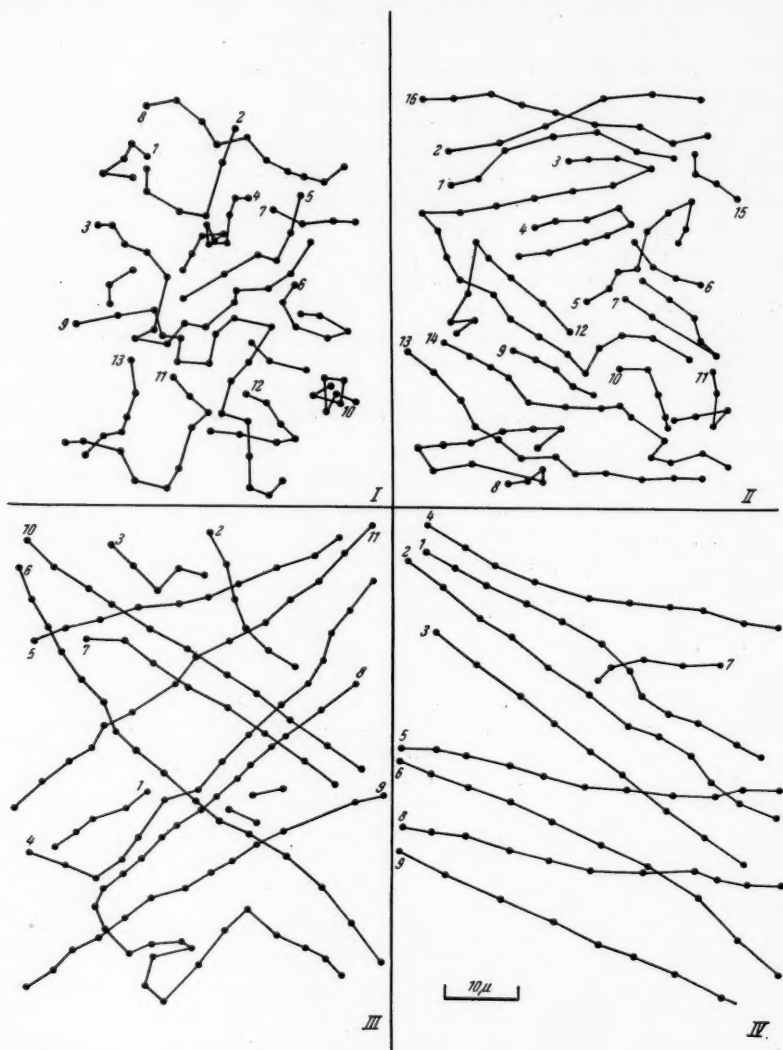


Abb. 2. Viermal die Mikrosomenbahnen an ein und derselben Stelle des Plasmawandbelages. I gleich nach der Präparation, II nach 40 Minuten, III nach 90 Minuten, IV am nächsten Tag. Die vier Bilder sind dieselben, aus denen die eingeringelten  $Q_T$ -Werte der Kurve F (Abb. 3) errechnet wurden.

kann schon von Strömung gesprochen werden. Daneben zeigen aber immer noch Teilchen die anfänglichen Bewegungen. Erst in einem viel späteren Stadium bewegen sich alle Teilchen gleichmäßig und nahezu in der gleichen Richtung. In diesen „alten“ Strömungen treten dann auch Plasmastränge auf, die sich vom Wandbelag lösen und den Zellsaft durchqueren. Abb. 2 zeigt die Veränderungen der Sphärosomenbahnen an ein und derselben Stelle. Die vier Bilder sind jene, aus denen die eingeringelten  $Q_r$ -Werte der Kurve  $F$  (Abb. 3) errechnet werden.

Neben dem unregelmäßigen Bewegungsbeginn fand sich bei großen alten Zellen der äußeren Zwiebelschichten noch ein zweiter, bei dem die Sphärosomen kreisende Bewegungen ausführten. Der Durchmesser dieser Kreisbahnen war kaum größer als das Zwei- bis Dreifache des Sphärosomendurchmessers. Diese Bewegungen waren dann, als schon von Strömung gesprochen werden konnte, nicht mehr zu sehen.

Leider ließ sich der erste Bewegungsbeginn graphisch nicht festhalten, weil die Verschiebungsbereiche zu klein waren. Wurde es dennoch versucht, so erinnerten die Bahnen sehr an die der Brownschen Bewegung, obwohl die Bewegung im Mikroskop viel beherrschter erscheint. Eine Auswertung dieser Bahnen war nicht möglich, da die Teilchen zu wenig den Ort veränderten.

Allgemein gilt für die Glitschbewegung, daß sie niemals von der Brownschen Bewegung überlagert ist. Die Teilchen gleiten entlang größerer Strecken immer ruhig weiter, ohne seitliche Ausschläge. Brownsche Bewegung und Glitschbewegung schließen einander gewissermaßen aus. Diese Beziehung mag der Grund gewesen sein, daß in der Literatur öfters die Meinung vertreten wurde, Brownsche Bewegung und Plasmabewegung seien verwandt bzw. hätten gleiche Ursachen (Mayer 1828, Meyen 1838, Nägeli 1860, A. Meyer 1920). Tatsächlich erfolgt der Bewegungswechsel bei einem Teilchen oft in der Art, daß eine scharfe Unterscheidung nicht möglich ist.

### Ergebnisse

In Abb. 3 sind auf der Ordinate die Werte von  $Q_r$  aufgetragen, auf der Abszisse die Zeit in Minuten von der Aufzeichnung der ersten Teilchenbahnen an gerechnet. Die Präparation erfolgte ca. 5 Minuten vorher. Bei Kurve  $F$  gelten die letzten zwei Werte für andere Zeiten. Wie man sieht, nahm bei allen Zellen die Regelmäßigkeit der Bewegung vom Beginn an allmählich zu. Es besteht ein kontinuierlicher Übergang von der Glitschbewegung bis zur regelmäßigen, fast rotationsartigen Strömung. Der durchschnittliche Wert von  $Q_r$ , der sich aus den ersten möglichen Messungen ergab, liegt bei 3,00, also in der Mitte zwischen ganz unregelmäßiger und vollkommen regelmäßiger Bewegung. Der niedrigste Wert von  $Q_r$  war 2,76 (Kurve  $F$ ). Bei Kurve  $A$  hörte die Bewegung bald auf. Bei Kurve  $F$  wurde  $Q_r$  auch am nächsten Tag bestimmt. Die Geschwindigkeit beschleunigte sich nach der Belichtung am Mikroskop und war dann ca. dreimal so groß wie am Vortag.

In Abb. 4 sind die oberen, ausgezogenen Kurven dieselben wie in Abb. 3, nur einzeln dargestellt. Die unteren, strichlierten, veranschaulichen die Schwankungen der Strömungsgeschwindigkeit. Die Werte entsprechen den

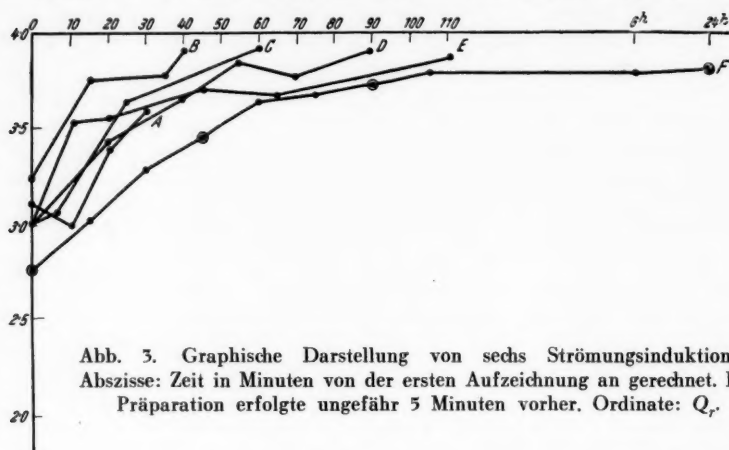


Abb. 3. Graphische Darstellung von sechs Strömungsinduktionen. Abszisse: Zeit in Minuten von der ersten Aufzeichnung an gerechnet. Die Präparation erfolgte ungefähr 5 Minuten vorher. Ordinate:  $Q_r$ .

Quadratwurzeln der mittleren Verschiebungsquadrate der einfachen Zeitintervalle. Der Vergleich von Geschwindigkeit und Größe der Regelmäßigkeit zeigt keine direkte Abhängigkeit. Wohl aber scheint eine gewisse Beziehung zur Steigerung der Regelmäßigkeit zu bestehen. An den Stellen, wo

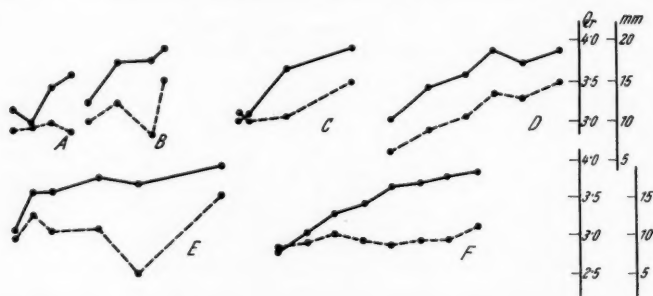


Abb. 4. Vergleich zwischen Regelmäßigkeit (ausgezogene Kurven, dieselben wie in Abb. 3) und Strömungsgeschwindigkeit (strichlierte Kurven). Fällt die Strömungsgeschwindigkeit stark ab, wie bei B und E, so nimmt auch die Regelmäßigkeitssteigerung ab. Eine direkte Abhängigkeit besteht nicht.

die Regelmäßigkeitssteigerung kleiner wird, ist auch meist eine Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit zu bemerken. Bei B und E ist dies sehr deutlich. Diese Beziehung spricht dafür, daß zur Steigerung der Regelmäßigkeit Strömung notwendig ist, von deren Stärke die Steigerung abhängt.

Neben den zeitlichen Veränderungen von  $Q_r$  in einer Zelle bestehen auch Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen. So war bei einer Zelle nahe der Zwiebelspitze  $Q_r = 3,07$ , bei einer Zelle derselben Schichte, aber an der Zwiebelbasis gelegen,  $Q_r = 3,92$ , obwohl die Bahnaufzeichnungen kurz nacheinander erfolgten. Nahe gelegene Zellen eines Blattes zeigten hingegen ähnliche Werte.

In den Zellen der tiefer gelegenen Zwiebelschichten nahm der  $Q_r$ -Wert ab, wie die folgende Tabelle zeigt.

1. Schicht:  $Q_r = 3,87$ ,
2. Schicht:  $Q_r = 3,86$ ,
3. Schicht:  $Q_r = 3,75$ ,
4. Schicht:  $Q_r = 3,40$ ,
5. Schicht:  $Q_r = 3,20$ ,
6. Schicht: nicht mehr aufzeichenbare Glitschbewegung,
7. Schicht: gleich regelmäßige Strömungsbewegung.

Der  $Q_r$ -Wert wurde hier aus einer einzigen Zelle berechnet, sondern aus vielen, die durch beliebiges, seitenparalleles Verschieben in das Blickfeld gerieten. Die Aufzeichnung der Bahnen erfolgte überall etwa 10 Minuten nach der Präparation. In der 7. und innersten Schichte war die Bewegung gleich regelmäßig vorhanden. Die Zellen waren grünlich gefärbt und anscheinend schon zum Keimling gehörig.

### Folgerungen

Die Steigerung von  $Q_r$  bei der Strömungsinduktion hat zwei Gründe. Es werden einerseits die Richtungen der einzelnen Strömungsimpulse orientierter und andererseits wird die Geschwindigkeit gleichmäßiger. Unter der Voraussetzung, daß jeder Impulsrichtung eine reale Plasmastruktur entspricht, ist danach bei der Strömungsauslösung eine Orientierungszunahme dieser Plasmastrukturen (Eiweißfibrillen?) anzunehmen. Dies könnte bedeuten, daß die Plasmastrukturen im ungereizten, nicht strömenden Plasma ziemlich unorientiert vorliegen und sich erst im Verlaufe der Strömungsentstehung langsam ordnen. Die aus Abb. 4 gezogene Folgerung, daß zur Regelmäßigkeitssteigerung Strömung notwendig ist, scheint darauf hinzuweisen, daß eine verstärkte Orientierung der Plasmastrukturen nur über die Strömung erfolgen kann. Somit könnte man der Plasmaströmung die Funktion zusprechen, die Plasmastrukturen aus einem unorientierten in einen orientierten Zustand überzuführen bzw. im orientierten zu erhalten, wobei eine gewisse Parallele zum thixotropen Verhalten gegeben scheint.

Die Feststellung, daß in jüngeren Zellen  $Q_r$  kleiner ist als in älteren, läßt die Vermutung zu, daß derselbe Vorgang, der sich bei der Strömungsinduktion schnell abspielt, nämlich Orientierungszunahme der Plasmastrukturen, in der ungestört älter werdenden Zelle ganz langsam vor sich geht. Wenn das verallgemeinert werden darf, bestünde hier eine Analogie zur elektronenmikroskopisch erschlossenen Fibrillenordnung in der Zellwand, deren Orientierung ja mit dem Zellalter ebenfalls zunimmt.

Aus der unorientierten Glitschbewegung stellt sich die regelmäßige Strömung immer parallel zur Zell-Längsachse ein, was etwa auf eine Einwirkung des Plasmalemmas zurückgeführt werden könnte.

Eine Orientierungszunahme submikroskopischer Plasmabestandteile durch die Strömung wurde auf Grund der Messung des Strömungsdichroismus auch von Pfeiffer (1953) festgestellt. In den Plasmasträngen von *Tradescantia*-Staubfadenhaaren ist danach diese Orientierung von der Strömungsgeschwindigkeit abhängig. Im Vergleich dazu dürften durch die hier gegebene Methode nur gröbere Strukturen erfaßt werden können, weil in einem Plasmastrang  $Q_r$  immer nahezu 4,00 ist, ganz gleich, ob die Strömungsgeschwindigkeit groß oder klein ist.

### Zusammenfassung

Die Sphärosomenbahnen in den Zellen der Innenepidermis von *Allium cepa* wurden mittels Zeichenapparates nachgezeichnet und eine Methode angegeben, die es gestattet, die Regelmäßigkeit der Plasmaströmung durch eine Zahl ( $Q_r$ ) zwischen 2,00 und 4,00 auszudrücken. Bei der Induktion der Protoplasmaströmung nach Präparation in Leitungswasser zeigte sich ein allmählicher kontinuierlicher Übergang von der unregelmäßigen Glitschbewegung ( $Q_r = \text{ca. } 3,0$ ) bis zur fast rotationsartigen Strömung ( $Q_r = \text{ca. } 3,9$ ). In den jüngeren Zellen der inneren Zwiebelschichten nahm der  $Q_r$ -Wert ab.

Unter der Voraussetzung, daß jeder Impulsrichtung eine Plasmastruktur entspricht, darf mit der Impulsorientierung auch eine Strukturorientierung angenommen werden. Die Überführung dieser Plasmastrukturen vom ungeordneten Zustand in einen mehr geordneten dürfte nur über die Strömung möglich sein und wird daher als deren Funktion angesehen.

### Literatur

- Dehneke, C., 1881: Flora 39, 8, 24.  
 Fitting, H., 1925: Jb. wiss. Bot. 64, 281.  
 — 1928: Jb. wiss. Bot. 67, 427.  
 — 1929: Jb. wiss. Bot. 70, 1.  
 — 1933: Jb. wiss. Bot. 78, 319.  
 — 1936: Jb. wiss. Bot. 82, 613.  
 — 1937: Ber. dtsh. bot. Ges. 55, 255.  
 Frank, B., 1872: Jb. wiss. Bot. 8, 216.  
 Hauptfleisch, P., 1892: Jb. wiss. Bot. 24, 173.  
 Mayer, A. F. T., 1828: Supplemente zur Lehre vom Kreislauf, Bonn.  
 Meyen, F., 1838: Neues System der Pflanzenphysiologie 2, 206, Berlin.  
 Meyer, A., 1920: Ber. dtsh. bot. Ges. 38, 56.  
 Nägeli, C., 1855: Pflanzenphysiologische Untersuchungen 1, Zürich.  
 — 1860: Beiträge zur wiss. Botanik 2, Leipzig.  
 Pfeiffer, H. H., 1953: Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 2.  
 Polster, R., 1949: Geschichte der Brownschen Molekularbewegung. Diss. Wien.  
 Wigand, A., 1885: Bot. Hefte 1, 169.

## Sammelreferat

### **Kallose**

(Ein kritischer Sammelbericht)

Von

**Walter Eschrich**

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Bonn

Mit 19 Textabbildungen und 1 Tafel

(Eingegangen am 24. April 1956)

	Seite
A. Einleitung . . . . .	488
B. Über die Natur der Kallose, ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften . . . . .	489
1. Kallofefärbungen (Einschlußmittel) . . . . .	489
2. Verhalten der Kallose gegenüber Chemikalien . . . . .	493
3. Physikalische Eigenschaften der Kallose . . . . .	496
4. Feinbau der Kallose . . . . .	497
5. Herkunft der Kallose . . . . .	497
C. Über Kallosevorkommen in Pflanzen . . . . .	500
1. Kallose in Siebröhren . . . . .	500
2. Kallose in den „Siebröhren“ der Algen . . . . .	503
3. Kallose an jungen Tracheiden . . . . .	504
4. Kallose in Milchröhren . . . . .	504
5. Kallose bei <i>Caulerpa prolifera</i> . . . . .	505
6. Kallose in Pilzen . . . . .	507
7. Kallose in Antheren, Pollenmutterzellen, Pollenkörnern und Pollenschläuchen . . . . .	511
8. Kallose in Wurzelhaaren . . . . .	513
9. Kallose in Trichomen . . . . .	514
10. Kallose in Zystolithen . . . . .	515
11. Kallose in Perikarprien . . . . .	516
12. Kallose in Abschlußgeweben . . . . .	516
13. Kallose in Lentizellen . . . . .	517
14. Kallose in der Wurzel-„Endodermis“ . . . . .	517
15. Kallose in Wundgeweben . . . . .	517
16. Kallose in Tüpfelkanälen . . . . .	518
D. Über die Bildung und den Abbau von Kallose . . . . .	519
1. Kallosebildung unter dem Einfluß chemischer Substanzen und Viren . . . . .	519
2. Mikrobieller Abbau der Kallose . . . . .	520
E. Zusammenfassende Diskussion . . . . .	521
Literatur . . . . .	525



## A. Einleitung

Kallose wurde zum erstenmal in den Siebröhren gefunden. Hanstein (1864) bezeichnete die hyalinen, stark lichtbrechenden Siebplattenbeläge als „Kallus“. Dieses aus der Sprache der Humanpathologie entlehnte Wort wird in der Botanik zur Bezeichnung von zweierlei Dingen verwendet: 1. Mikroskopisch sichtbare Zellbestandteile von polster- oder kissenförmiger Gestalt; 2. Gewebewucherungen, die nach Verletzungen entstehen können. Der Kallus zweiter Art wird besser als „Wundkallus“ oder „Kallusgewebe“ bezeichnet, er hat mit unseren Betrachtungen nichts zu tun. Lediglich mit dem Kallus erster Art beschäftigt sich der vorliegende Sammelbericht. Diese Kalli (im einzelnen als „Siebröhrenkallus“, „Tüpfelkallus“ usw. bezeichnet) stehen immer in Berührung mit der Zellwand, an der sie auch haften bleiben, wenn die betreffende Zelle plasmolysiert wird.

Nachdem außerhalb der Siebröhren Kalli auch in anderen Pflanzenorganen gefunden worden waren, stellte man fest, daß die Substanz dieser Kalli gleiches färberisches und chemisches Verhalten zeigte. Mangin führte deshalb 1890 den Namen „Kallose“ ein. Kallose ist die chemische Bezeichnung für die Kallussubstanz.

Auf die Entdeckung Gardners (1885), daß auch junge Tracheiden Kallose führen können, folgten sehr bald weitere Entdeckungen von Kallosevorkommen außerhalb der Siebröhren (Rendle 1889, Mangin 1889, 1891, 1892). Das Auftreten der Kallose scheint von bestimmten, vorläufig noch unbekannten Bedingungen abhängig zu sein. Bereits Fischer (1886) fand, daß auch abgeschnittene Stengelteile noch Siebröhrenkallose bilden können. Schumacher (1930) stellte fest, daß beim Einleiten von Eosinlösung in den Siebröhren große Mengen von Kallose gebildet werden. Die gleiche vermehrte Kallosebildung ruft das Blattrollvirus in Kartoffelsiebröhren hervor. Eine chemische Analyse der Siebröhrenkallose liegt noch nicht vor. Andere Kallosen erwiesen sich als ein Polysaccharid, das aus *d*-Glukose aufgebaut ist (Mangin 1910, Eschrich 1954). Eine Identität mit anderen bekannten Polysacchariden liegt nicht vor. Über die physiologische Bedeutung der Kallose lassen sich vorläufig nur Vermutungen anstellen. Es dürfte aber feststehen, daß die Kallose keinen im eigentlichen Sinne regelmäßigen anatomischen Bestandteil darstellt wie etwa Stärke oder Zellulose. Ihre Bildung — zumindest ihre Vermehrung — wird durch bestimmte Einflüsse ausgelöst, die möglicherweise auch von außen auf die Pflanze einwirken.

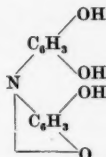
Wie es scheint, rückt die Kallose neuerdings wieder stärker in das Blickfeld des wissenschaftlichen Interesses. Es sei nur an die Bedeutung erinnert, welche der Kallosenachweis für die Diagnose von Viruserkrankungen in der Phytopathologie gefunden hat. Es schien daher an der Zeit, die bisher vorliegende, sehr zerstreute Literatur über die Kallose zusammenfassend zu sichten. Diese Aufgabe will der vorliegende Sammelbericht übernehmen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Bei der Durchsicht der Literatur hat es sich als nötig erwiesen, zahlreiche Angaben experimentell nachzuprüfen, einmal, weil die betreffenden Entdeckungen weit zurückliegen und auf Grund ihrer Darstellung neueren Anschauungen nicht mehr genügen würden, zum anderen, weil die Autoren Nachweismethoden benutzten, die mit heute anerkannten Methoden möglicherweise negative Ergebnisse liefern könnten. Erwartungsgemäß ergaben sich bei dieser Arbeit noch einige Neu-

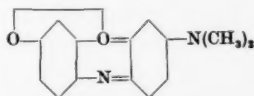
## B. Über die Natur der Kallose, ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften

### 1. Kallofefärbungen (Einschlußmittel)

Bevor Tswett (1911) das Resorzinblau für die Histologie entdeckte, war dieses als Indikator in mannigfachen Herstellungsverfahren und Abwandlungen gebräuchlich. Zunächst stellte Luynes (1864) aus Orcin, Ammoniak, Natriumcarbonat und Wasser einen ähnlichen Farbstoff mit metallischem Glanz her, der sich wenig in Wasser löste und in Säuren rot, in Alkalien blauviolett gefärbt war. Von Wartha (1876) wird ein dem Orcein ähnlicher roter Farbstoff beschrieben, der neben Indigo als Beimengung in Lackmuskwürfeln gefunden wurde. Das durch Oxydation in ammoniakalischer Lösung aus Orcin hergestellte Orcein färbt Kallose, aber auch Zellkerne rot (Eschrich 1953). Den ersten, mit Resorzinblau wahrscheinlich identischen Farbstoff stellten Benedikt und Julius (1884) in der Weise her, daß sie 55 Mol Resorzin mit 18 Mol  $\text{NaNO}_2$  mischten und auf  $130^\circ$  erhitzten, wobei  $\text{NH}_3$  entwich. Die erstarrte blaue Masse ergab nach Umkristallisieren aus Wasser Kristalle mit kupferrotem Reflex, die Indikatoreigenschaften besaßen. In demselben Jahr veröffentlichten Traub und Hock (1884) das gleiche Rezept und gaben der Substanz den Namen Lackmold. Nach Schultz (1931 I, Nr. 1022) ist das von Benedikt und Julius (1884) entdeckte Resorzinblau mit dem Lackmold von Traub und Hock (1884) identisch. Unter dem Namen Lackmold bzw. Resorzinblau kursieren verschiedene Substanzen: z. B. das für Indikatorzwecke bestimmte, jedoch, abgesehen von seiner Schwerlöslichkeit in Wasser, für histologische Zwecke gut brauchbare „Lackmold puriss. in lamellis“ (Merck)<sup>2</sup>:



Unter der Bezeichnung Resorzinblau (Merck) ist der Tanninlack des Dimethylamino-diphenoxazons im Handel. Die Formel:



zeigt jedoch, daß es mit dem Lackmold (s. o.) nicht identisch ist. Als Kallosefarbstoff kommt dieses Resorzinblau nicht in Betracht. Ebenfalls unbrauchbar ist das Resorzinblau der Gesellschaft für chemische Industrie, Basel. Hierbei handelt es

beobachtungen, die in den vorliegenden Bericht eingereiht und gemeinsam mit bekannten Befunden besprochen werden sollen.

Für wertvolle Hinweise bin ich meinem Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. M. Steiner, sowie den Herren Prof. Dr. H. B. Carrier (Davis) und Prof. Dr. K. Mühlethaler (Zürich) zu größtem Dank verpflichtet.

<sup>2</sup> Mercks Berichte 1903, p. 109.

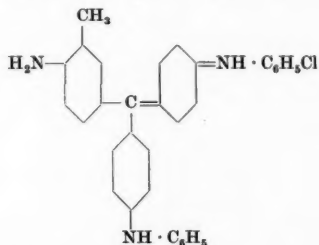
sich um das Ammoniumsalz des Tetrabromresorufins (Tetrabromoxydiphenoxazon). Geeignet zum Kallosenachweis sind die Farblösungen, wie sie Wurster (1887) (ammoniakalische Lösung von Resorzin mit wenig  $\text{H}_2\text{O}_2$  erwärmen) oder Tswett (1911) (1 Tl. Resorzin, 100 Tl. Wasser, 0,1 Tl.  $\text{NH}_3$ ) beschrieben haben. Die Methode nach Tswett ist in Strasburgers Praktikum aufgenommen und von da in alle folgenden einschlägigen Arbeiten übernommen worden. Von einigen Autoren wird empfohlen, Borax der Farblösung zuzusetzen. Auch Mehrfachfärbungen mit Resorzinblau wurden bekannt: z. B. Kombination von Resorzinblau mit dem „réactif genevois“ (Chrysoidin, Kongorot) oder Safranin-Resorzinblau (Strasburger und Koernicke 1923). Sehr schöne Ergebnisse erzielte Esau (1948) mit der Kombination: Bismarckbraun, Jodgrün und Resorzinblau, jeweils 1:5000 (vgl. aber auch Nebel 1931, Cheadle, Gifford und Esau 1953).

Nach meiner Erfahrung gibt das leicht selbst anzusetzende Resorzinblau oder Resoblau die besten Ergebnisse: 3 g frisches Resorzin puriss. oder pur. werden in ca. 200 ml Aqua dest. gelöst, mit 1 ml  $\text{NH}_3$  (35%ig) versetzt und in einem lose verschlossenen Erlenmeyerkolben ca. 10 Minuten erhitzt (nicht kochen!). Die Lösung färbt sich dunkel weinrot und wird nach 1–2 Tagen dunkel blaugrün mit schmutziggroener schwacher Fluoreszenz. Nun wird dieses Oxydationsprodukt 1 Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt (wobei eine tiefblaue Lösung entsteht), in eine flache Abdampfschale filtriert und auf dem Wasserbad eingedunstet, bis keine  $\text{NH}_3$ -Dämpfe mehr entweichen (Probe mit feuchtem rotem Lackmuspapier in der Dampfzone). Die Lösung hält sich in einem Pipettenfläschchen mindestens ein halbes Jahr, ohne zu verpilzen. Zum Gebrauch gibt man zu 10 ml Wasser 1–2 Tropfen Farblösung. In dieser Lösung wird Kallose innerhalb 30 Sekunden himmelblau gefärbt, ohne daß die Zellen absterben (Probe durch Plasmolyse und Deplasmolyse). Nach 1–2 Minuten färben sich lignifizierte Membranen, z. T. auch stärkeführende Plastiden, schwach graublau. Sprau (1953) bekam bei einer Verdünnung der Tswettschen Stammlösung von 1:8000 noch deutliche Kallosefärbung. Baerecke (1955) setzt der Farblösung 5%ige Priloder Reilösung zu, um ein schnelleres Eindringen in die Schnitte zu erzielen.

Neben dieser m. E. besten Kallosefärbung sind eine Reihe anderer Kallosereagenzien empfohlen worden, von denen jedoch nur wenige wirklich brauchbar sind.

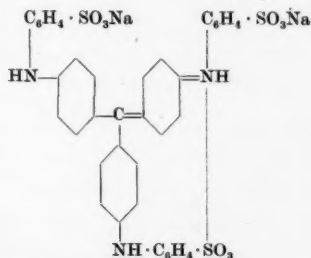
Anilinblau: wurde von Russow (1881) für die Kallosefärbung entdeckt. Anilinblau wird in wässriger Lösung meist 1:1000 verwendet und färbt Kallose ebenso himmelblau wie Resorzinblau.

Die Firma Merck (Darmstadt) führt sowohl das alkohollösliche Anilinblau (Art. Nr. 1269) <sup>3</sup>:



<sup>3</sup> Die Strukturformeln wurden mir von der Firma Merck freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

(Diphenyl-*p, p'*-diamino-methylfuchsonimoniumchlorid), das als Ausgangsstoff für die Herstellung der Sulfosäuren, wie z. B. Alkaliblau und Wasserblau, dient, aber zur Kallösefärbung ungeeignet ist, als auch wasserlösliches Anilinblau (Art. Nr. 1275) <sup>2</sup>:



(Die Stellung der Sulfogruppen ist unsicher.)

welches das entmethylierte und dreifach sulfonierte Na-Salz darstellt.

Dem Vorteil des Anilinblau, in Glyzeringelatine haltbar zu sein, stehen jedoch die Nachteile gegenüber, daß es in wässriger Lösung sehr leicht ausflokt und — wenn auch in geringem Maße — Zellwände und Protoplasten anfärbt. Besonders schnell scheinen Entmischungsprodukte des Plasmas angefärbt zu werden. So konnte ich feststellen, daß mit verdünnter Anilinblaulösung behandelte lebende Epidermiszellen nach Zusatz von Eisessig plötzlich leuchtendblaue Plasmaklumpen enthielten.

Nach Mangin (1890 b) sind alle blauen Farbstoffe aus der Triphenylaminmethangruppe in saurem Medium zur Kallösefärbung geeignet. Mit steigender Sulfonierung soll die Färbung intensiver werden.

Insbesondere sind es die Alkalisalze, die zur Kallösefärbung geeignet sind, wie z. B. das „Blau 6 B“, welches als „bleu soluble pour coton 6 B“ von der Société anonyme des matières colorantes et produits chimiques, St. Denis (Seine), geliefert wurde. Dieser Farbstoff enthält drei  $\text{SO}_3\text{Na}$ -Gruppen und ist mit Mercks Methylblau für Baumwolle MLB identisch. Gleichfalls damit identisch sind andere, von Mangin angeführte Farbstoffe: z. B. Diphenylaminblau (Sandoz AG., Basel), Baumwollblau (früher: Wülfing Dahl & Co. AG., Barmen), Bayrisch-Blau DBF (Bayer, Leverkusen), Wasserblau (viele Fabriken, u. a. Merck) oder Marineblau (Merck).

Die Angaben Mangins lassen sich insofern schlecht nachprüfen, als Bezugsquellen fehlen und zudem einige Farbstoffbezeichnungen nicht mit der Originalbezeichnung wiedergegeben sind. Ein Blick in Schultzs Farbstofftabellen (1931) genügt, um festzustellen, daß einerseits die von Mangin genannten Farbstoffe größtenteils miteinander identisch sind, andererseits aber eine genaue Zuordnung zu modernen Bezeichnungen und lieferfähigen Bezugsquellen unmöglich ist. Ein weiterer Teil früher beliebter Farbstoffe ist heute nicht mehr erhältlich, da diese offenbar nichtgereinigte Produkte darstellten.

Säureviolett und Pariser Violett 6 B, sämtlich als Alkalisalze.

Als weitere Kallösefarbstoffe dieser Stoffgruppe nennt Mangin: Säurefuchsin,

Ein brauchbarer Kallösefarbstoff ist das Corallin. Es handelt sich hierbei um die Alkalisalze der Rosolsäure (Merck) (= rotes Corallin der Grässer-

Monsanto, Chem. works, Ruabon, N. Wales), die zunächst von Szyszyłowicz (1882) in Verbindung mit Sodalösung zur Färbung von „Stärkeschleimen“ verwendet wurden. Corallin-Soda färbt Kallose leuchtend ziegel- bis orangerot, daneben aber auch Zellulose. Die Färbung ist nicht haltbar. Rotes Corallin ist wahrscheinlich ein Gemisch von Pararosanilinsäure und Pararosanilin (Rosolsäure = Dioxycarbazon).

In jüngerer Zeit hat Arens (1949) die Triaminotriphenylmethanfarbstoffe Anilinblau, Wasserblau, Brillantblau (wahrscheinlich Brillantblau 8 B der BASF), Baumwollblau, Alkaliblau, Nicholsonblau, Victoriablau und auch das Corallin in der Weise zum Kallosenachweis benutzt, daß er sie, in 30%iger Essigsäure gelöst, als Fluoreszenzfarbstoffe anwendet. Ich habe den größten Teil dieser Färbungen nachgeprüft, konnte jedoch bei keiner eine spezifische Kallosefluoreszenz feststellen.

Das Anilinblau hat neuerdings wiederum stark an Bedeutung gewonnen, weil es in alkalischer Lösung eine starke grüngelbe Kallosefluoreszenz hervorruft (Currier und Strugger 1956). Das wasserlösliche Anilinblau wird hierzu in 0,005%iger Lösung mit 1/15 mol  $K_2HPO_4$  (oder einer Mischung von  $K_2HPO_4$  und  $K_3PO_4$ ) auf das pH 8–10 gepuffert. Hierbei dürfte es sich um den empfindlichsten bisher bekannten Kallosenachweis handeln, allerdings ist zu beachten, daß verkorkte Membranen ebenfalls, aber etwas stärker gelb, fluoreszieren.

Einen ähnlichen fluoreszenzoptischen Nachweis beschreibt Arnold (1956). Er stellte durch Chromatographie fest, daß die Farbstoffe Wasserblau 6 B extra (Bayer, Leverkusen), Wasserblau stand. (Bayer, Leverkusen) und Wasserblau (Merck) eine gelbgrün fluoreszierende Komponente enthalten. Diese Komponente läßt sich isolieren und liefert ein Kallose-Fluorochrom, das längere Zeit haltbar sein soll.

Farbstoffe, die neben Zellulose auch Kallose anfärben, sind vor allem Vertreter der Benzidinreihe. Im alkalischen Bade färben: Bordeaux extra, Kongo GR, Kongo Korinth, Deltapurpurin G, Kongo Brillant G, Azoblau, Kongo Korinth B, Benzopurpurin, Rosazurin, Azoviolett, Benzoazurin und Heliotropin neben Zellulose auch Kallose (Mangin 1890). Nach Sprau (1995) benutzt man eine Verdünnung von 1:200 mit 10%iger Sodalösung.

Als besonders elektiven Kallofefarbstoff bezeichnen Strasburger und Koernicke (1923) das Brillantlackblau G extra (Bayer, Leverkusen). Sprau (1955) verdünnt 1:1000 mit 1–3%iger Essigsäure. Tatsächlich färbt dieser Farbstoff nur Kallose, jedoch tritt die Färbung erst nach längerer Differenzierung in Glycerin hervor, da zunächst alles andere (Plasma, Zellulose, lignifizierte Wände, Stärke) einheitlich graublau angefärbt wird. Die schließlich erhaltene himmelblaue Kallofefärbung ist im Vergleich zu Resorzinblau selbst nach 6 Stunden Färbezeit so schwach, daß dünnere Kallosebeläge gar nicht sichtbar werden.

Der einfachste und sicherste Nachweis der Kallose ist zweifellos die Resorzinblau- oder Resoblaufärbung (vgl. Tafel 1, Abb. 1–9). Diese Färbung ist deshalb so wichtig, weil sie infolge ihrer Selektivität ohne weiteres als Kalloseindikator benutzt werden kann. Ich möchte sogar vorschlagen, zunächst alles das als Kallose zu bezeichnen, was sich im neutralen bis schwach alkalischen Bereich mit Resorzinblau leuchtend blau färbt.

Für die Haltbarmachung mit Resorzinblau gefärbter Kallose in Dauerpräparaten ist noch nichts Befriedigendes gefunden worden. Ich benutze seit einiger Zeit ein Hoyersches Gemisch (Kisser 1926):

150 g Gummiarabikum, ausgesucht weiße Stücke werden pulversiert und mit ca. 100 ml offizineller Kaliumazetatlösung (33,5% in Aqua dest.) übergossen. Nach 2–3 Tagen entsteht ein Sirup (evtl. mit Kaliumazetat weiter verdünnen, bis etwa die Viskosität von frischem Caedax erreicht ist). Der Sirup wird dann durch ein dickes, aber grobes Filter (Extraktionshülse) filtriert. Die schwachgelbliche, opalisierende Lösung hat einen Brechungsindex von  $n_D = 1,396$ . Eine Umrandung mit Caedax darf erst nach ca. 1 Monat erfolgen.

Über die Haltbarkeit der Resorzinblaufärbung in diesem Medium läßt sich noch keine Angabe machen.

Alle sonst bekannten Einschlufmittel entfärben nach kurzer Zeit (Glyzerin-gelatine, Euparal, Karion); oder sie sind ungeeignet, weil sie eine Entwässerung in Alkohol oder Benzol voraussetzen (Caedax, venezianischer Terpentin). Als flüssiges Einschlufmedium hat sich Kaliumazetat (Kaliumazetat, Methanol, Aqua dest. zu gleichen Teilen) bestens bewährt.

## 2. Verhalten der Kallose gegenüber Chemikalien

Neben den Färbemethoden gibt es noch eine beschränkte Anzahl von Reagenzien, die zur Charakterisierung der Kallose beitragen können.

Die auffälligste Eigenschaft der Kallose ist, daß sie sich im Gegensatz zu Zellulose nicht in Cuoxam (Kupferoxydammoniak) löst (Abb. 1). Über diese Eigenschaft herrscht Einigkeit bei allen Autoren, ausgenommen Küster (1951), der Kallosepolster alter *Cucurbita*-Wurzel-siebbröhen in Cuoxam quellen und schließlich sich lösen sah. Ich habe am gleichen Objekt Küsters Angaben nachgeprüft und stets eine Unlöslichkeit der Kallose in Cuoxam festgestellt. Dabei benutzte ich sowohl das käufliche Schweizer-sche Reagens als auch — und zwar in der Hauptsache — aus  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  und  $\text{NH}_3$  (33%ig) selbst hergestelltes Cuoxam. Kallose, gleich welchen Ursprungs, ist in Cuoxam unlöslich.

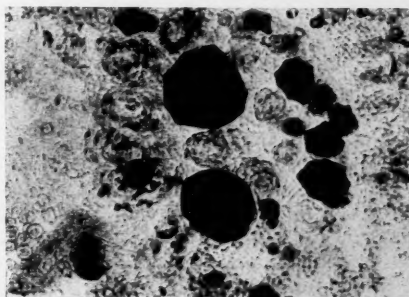


Abb. 1. Siebbündel von *Victoria cruziana*, quer, mit Cuoxam behandelt, Resorzinblaufärbung. Kallosebeläge dunkel, Stärke = helle Körnchen. (520 $\times$ .)

In neuerer Zeit sind, namentlich seitens der Textilindustrie, Bestrebungen im Gange, das Cuoxam durch andere Metallkomplexe zu ersetzen. So sind neben farbigen Präparaten, wie Cuoxen (Diäthylendiamin-Kupfer(II)-hydroxyd), Cooxen (desgl. mit Co als Metall), Nioxam (Ni-Komplex mit  $\text{NH}_3$ ), Nioxen (Ni-Komplex mit Äthylendiamin) auch farblose Komplexbildner gefunden worden. Zusammenfassend berichtet J a y m e (1951) über die Entwicklung bis zu dem von J a y m e und N e u s c h ä f f e r (1955) gefundenen, eine farblose Lösung bildenden Zinkoxen (Tri-äthylendiamin-Zn-hydroxyd). Der Vorteil dieser Komplexe liegt in der Farblosigkeit. Die Cu-haltigen Komplexe überdecken mit ihrer Blaufärbung sehr leicht die Resorzinblaufärbung der Kallose, so daß ein einwandfreier Nachweis der Kallose nach der Cuoxam-Behandlung nur nach oft sehr schwierigem



und gründlichem Ausfällen und Auswaschen möglich ist. Über die Brauchbarkeit des Zinkoxens in der Mikroskopie liegen jedoch noch keine Angaben vor.

Alle weiteren Kalloserieaktionen seien im folgenden, nach Reagenzien geordnet, besprochen:

#### Säuren:

Eisessig: unlöslich (Schmidt 1917). Zur Fixierung von Kallosepräparaten wird gern die Carnoysche Flüssigkeit (Alkohol-Eisessig) benützt.

$\text{HNO}_3$  verdünnt, kalt: schwache Quellung (Schmidt 1917).

$\text{HNO}_3$  verdünnt, heiß: starke Quellung, Kallose wird durchschimmernd (Schmidt 1917).

$\text{HNO}_3$  verdünnt, heiß  $+$   $\text{NH}_3$ : keine Xanthoprotein-Reaktion (Schmidt 1917).

$\text{HNO}_3$  konzentriert: starke Quellung, nach zweimaligem Aufkochen tritt Lösung ein (Schmidt 1917).

$\text{HCl}$  kalt, 1–20%: unlöslich, höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht (Ref.).

$\text{H}_2\text{SO}_4$  5%ig bei 90°C: nach mehreren Stunden noch keine Lösung. Schmidt (1917) unterscheidet damit von Hemizellulosen, die gelöst werden: er wendet sich gegen den Ausdruck „Kalloseschleim“ (S. 6).

$\text{H}_2\text{SO}_4$  2%ig bei 120°C: bei Zystolithenkallose tritt nach 30–35 Minuten Hydrolyse ein (Eschrich 1954).

$\text{H}_2\text{SO}_4$  konzentriert, kalt: löst leicht (Wilhelm 1880, Strasburger-Koernicke 1923).

Chromsäure konzentriert: löst leicht (Schmidt 1917).

Pikrinsäure: Gelbfärbung (Schmidt 1917), völlig unspezifisch, da praktisch alles gelb gefärbt wird (Ref.).

Alle verdünnten Säuren: unlöslich (Mangin 1910).

Alkalien: Eau de Javelle, kalt: löst Siebröhrenkallose (ohne Zeitangaben) (Schmidt 1917). Löst nicht (ohne Zeitangaben) (Mangin 1910). Mangin (1892 b) behandelte *Vitis*-Blätter, die mit *Peronosporaceen*-Mycel befallen waren, in Eau de Javelle und bekam anschließend noch eine Anilinblaufärbung in den Pilzzellwänden.

Das in der Mikroskopie zum Weglösen des Protoplasmas gebräuchliche Eau de Javelle (Kisser 1926, p. 103), das aus Chlorkalk und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  hergestellt wird, greift Siebröhrenkallose erst nach 1–2 Tagen an. Allmähliche Lösung der Kallose tritt nur ein, wenn die Lauge erneuert wird. Das im Handel als Eau de Javelle erhältliche Natriumhypochlorit löst Kallose innerhalb weniger Minuten bis höchstens 1 Stunde, wobei aber auch Parenchymzellwände glatt mitgelöst werden.

Alkalilaugen: Wie Mangin (1892 b) berichtet, lösen 1%ige NaOH und KOH Kallose auf. Das gleiche berichtet Schmidt (1917). Wilhelm (1880) schrieb schon früher, daß verdünnte KOH Siebröhrenkallose zum Quellen bringt und nach Stunden, oft aber erst nach Tagen löst. Diese Befunde sind von Strasburger und Koernicke (1923) in das „Praktikum“ aufgenommen worden und werden auch heute noch daraus zitiert. Nach meinen Untersuchungen hängt der Lösungsvorgang der Kallose in 1–2%iger Alkalilauge von der Dauer der Einwirkung, von dem Alter bzw. Quellungszustand und von der Dicke des Kallosebelages ab; und zwar löst sich Kallose in jungen (kernhaltigen) und toten (obliterierten) Siebröhren langsamer als die Kallose funktionstüchtiger Siebröhren. Kallose alkohol-



fixierter Präparate wird oft erst nach wochenlanger Einwirkung 2%iger KOH angegriffen. Kallose, die mit 5%iger kalter  $H_2SO_4$  vorbehandelt wurde, wird in 2%iger KOH sehr schnell gelöst. Wie Baerecke (1955) berichtet, wird die durch Virusinfektion gebildete Siebröhrenkallose selbst in 5%iger Alkalilauge nach 8 Tagen noch nicht gelöst. Offensichtlich ist die Dichte der Kallose veränderlich, die Löslichkeit oder Unlöslichkeit in verdünnter Alkalilauge ist deshalb als Kriterium für das Vorhandensein von Kallose nicht brauchbar.

Der Streit zwischen Tanret und Mangin, der, um weitere Mißverständnisse zu verhüten, hier erwähnt werden soll, entbehrt deshalb eines eindeutig definierten Gegenstandes.

Tanret (1897) beschrieb eine „Fongose“, die er aus dem Mycel von *Aspergillus niger* isolierte und die sich in 5%iger Alkalilauge nicht löste. Mangin revidierte 1910 seine Aussage von 1894 über die Löslichkeit der Kallose in 1%iger Alkalilauge, weil seine aus Pilzhypen isolierte „Kallose“ in 6%iger Alkalilauge unlöslich war und behauptete in der Zusammenfassung, Kallose sei in verdünnten Alkalilaugen unlöslich. Diese Aussage benutzte Tanret (1910), um seine „Fongose“ gegen eine Einbeziehung in die Kallosegruppe zu verteidigen, denn die „Fongose“ war ja nur in 5%iger Alkalilauge unlöslich. — Augenscheinlich handelt es sich bei der Pilzkallose Mangins und der „Fongose“ Tanrets um ähnliche Substanzen, die entweder Alkalilaugen gegenüber sehr resistente Kallosen darstellen oder aber nichts mit Kallose zu tun haben. Eine Entscheidung ist nicht möglich, da Kallose offensichtlich in Pilzhypen auftritt (Farr 1954 u. a.), wenn auch außer Mangin niemand der Meinung war, daß ganze Hyphenwände aus Kallose bestehen (vgl. S. 509).

$NH_3$ : hat quellende Wirkung (Wilhelm 1880, Mangin 1892 b).

$H_2O$ : unlöslich (Mangin 1892 b). Pringsheim und Krüger (1952) sprechen von „Kalloseschleimen“, die in Wasser kaum quellen, sich später aber plötzlich lösen. Diese Lösung dürfte auf bakterielle Zersetzung (Eschrich 1954) zurückzuführen sein (vgl. S. 16). In keimfreiem Wasser wird Kallose auch nach Monaten nicht gelöst.

Organische Lösungsmittel:

Glycerin: unlöslich, bei  $280^\circ C$  tritt Lösung ein im Gegensatz zu Zellulose, die bei  $300^\circ C$  noch nicht gelöst ist (Van Wisselingh 1898, Miranda 1913 b).

Äthanol	} unlöslich (Pringsheim und Krüger 1952).
Äther	
$CS_2$	

Salzlösungen:

$CaCl_2$  konzentriert, kalt: löslich (Mangin 1892 b, Sprau 1955), nicht löslich nach 8 Tagen (Baerecke 1955).

$SnCl_2$  konzentriert, kalt: löslich (Mangin 1892 b, Sprau 1955).

$Na_2CO_3$	} konzentriert, kalt: unlöslich (Mangin 1892 b).
$K_2CO_3$	

$K_2CO_3$  konzentriert + Äthanol: diese Mischung benutzte Mangin (1910), um die Hyphen parasitischer Peronosporaceen in *Vitis*-Blättern für übliche Kallosereaktionen zu präparieren. Mangin meinte, daß infolge eines höheren Polymerisationsgrades dieser „Kallose“ eine derartige Präparation nötig sei.

### Verschiedene Reaktionen:

Bromwasser: bildet mit Kallose der Pilzzellwände ein stabiles Produkt, das in 1%iger Sodalösung eine sirupöse Flüssigkeit bildet, die durch Äthanol wieder gefällt werden kann (Mangin 1910).

Chloralhydrat: wirkt quellend (Strasburger und Koernicke 1923).

Chloraljod: wirkt quellend (Strasburger und Koernicke 1923).

Jodreagenzien: färben gelb bis gelbbraun.

Chlorzinkjod: färbt gelbbraun und bewirkt leichte Quellung. Fischer (1886) beobachtete, daß frisches, unzersetztes Chlorzinkjod Siebröhrenkallose ungefärbt läßt.

### Enzyme:

Filtragol (pektinlösendes Enzym) kalt: löst nicht.

Pepsin (in Glycerin gelöst): unlöslich.

Trypsin: unlöslich.

Papain (mit NaCN aktiviert): unlöslich.

Ptyalin: unlöslich (Schmidt 1917).

### 3. Physikalische Eigenschaften der Kallose

Der allgemein verbreiteten Ansicht, daß Kallose amorph (Molisch 1923) und optisch isotrop (Wilhelm 1880) ist, steht als einziges Gegenargument die letzte Arbeit Küsters (1951) gegenüber. Küster untersuchte alte *Cucurbita*-Wurzeln und fand die Kallose der Siebröhren teilweise in sechseckigen Platten abgelagert. Diese Kallose quoll in Cuoxam und ging schließlich in Lösung, ferner war sie optisch anisotrop, und zwar war das Vorzeichen ihrer Doppelbrechung dem der Zellulose entgegengesetzt.

Um diese einzigen gegenteiligen Befunde nachzuprüfen, untersuchte ich Siebröhrenkallose, die ebenfalls aus *Cucurbita*-Wurzeln stammte, die im November nach dem ersten Frost ausgegraben wurden. Im polarisierten Licht konnte ich, auch nach Einschalten von Gips Rot I, niemals Doppelbrechung wahrnehmen. Auch die Löslichkeit in Cuoxam war nicht zu beobachten. Weiterhin untersuchte ich folgende Kallosevorkommen im Polarisationsmikroskop:

Keimhof- (Oncus-) Kallose von *Cucurbita*-Pollen.

Kallose im Abschlußgewebe des *Ophioglossum*-Rhizoms.

Trenngewebekallose im Blattstiel von *Aesculus hippocastanum*.

Epidermiskallose im Perikarp von *Myrrhis odorata*.

Kallosemembranen der Pollenmutterzellen von *Campanula rapunculus*.

Hyphenkallose von *Phytophthora infestans*.

Tüpfelkallose im Perikarp von *Phacelia tanacetifolia*.

Epidermiskallose im Perikarp von *Cerinth alpina*.

Endokarpykallose von *Symphytum officinale*.

In keinem Fall konnte ich Doppelbrechung wahrnehmen.

Was die Quellfähigkeit der Kallose betrifft, so wurde niemals eine unbegrenzte Quellung wahrgenommen. Bei den Reagenzien, die eine Lösung der Kallose verursachen, tritt diese wohl immer unter Hydrolyse ein. Ein Kallose-Sol wurde nur im bromierten Zustand (Mangin 1910) und im Zustand der bakteriellen Zersetzung (Eschrich 1954) gefunden. Die Kallose scheint eher ein sehr begrenztes Quellungsvermögen zu haben und in gelartigem Zustand vorzuliegen. Bei schwachem Druck zeigt sie eine schwache Elastizität, bei starkem Druck zerspringt sie mit fast glattem

Bruch (Wilhelm 1880). Hanstein (1861) spricht von knorpeliger Konsistenz der Kallose.

#### 4. Feinbau der Kallose

Der hin und wieder auftauchende Ausdruck „Kalloseschleim“ ist nur insofern berechtigt, als manche echten Pflanzenschleime (*Linum usitatissimum*, *Plantago psyllium*) ebenso wie Kallose in Cuoxam unlöslich sind. Zudem bleibt Kallose in 20%iger HCl und verdünnter HNO<sub>3</sub> ungelöst, also in Agenzien, die Stärkeschleime sofort lösen. Eine besondere Art von Pflanzenschleimen, die sich — wenigstens für einige Zeit — mit Resorzinblau anfärben lassen, würden den Ausdruck „Kalloseschleim“ am ehesten rechtfertigen. So erhielt ich bei *Calluna-vulgaris*-Blättern eine Kallosefärbung in der Schleimepidermis. Die Schnitte mußten dazu mit 60%iger alkoholischer Resorzinblaulösung behandelt werden, da der Schleim in wässrigen Medien sofort stark quillt und zerfließt. Dieser Schleim wird von Walliczek (1893) zu den Membranschleimen gerechnet. Esdorn und Schanze (1954) geben an, daß der *Calluna*-Schleim vom Protoplasma abgesondert wird. Bei *Arbutus unedo* und *Barosma crenulatum* konnte ich jedoch keine Resorzinblaureaktion erhalten. Der *Calluna*-Schleim färbt sich nur im ungequollenen Zustand (in Alkohol) mit Resorzinblau. Sobald Wasser eingelagert wird, verschwindet die Färbung. Da die Resorzinblaufärbung wahrscheinlich eine Adsorptionsfärbung darstellt, ist anzunehmen, daß der *Calluna*-Schleim im ungequollenen Zustand eine der Kallose ähnliche Molekularstruktur besitzt. In Cuoxam löst sich der Schleim jedoch sofort auf. Es kann sich also nicht um Kallose handeln. Auf Grund der gleichen Löslichkeit in Cuoxam kommen auch alle Zelluloseschleime nicht in Betracht.

Auf die Quellfähigkeit der Kallose ist in mehreren Arbeiten hingewiesen worden (S. 494), jedoch bezieht sie sich nicht auf Wasser, und mit Ausnahme starker Alkalien tritt niemals eine so typische starke Quellung ein, wie sie für Schleime charakteristisch ist. Die elektronenoptische Untersuchung hat gezeigt, daß alle Pflanzenschleime eine Struktur besitzen, die durch das immer vorhandene Zellulosegerüst bedingt ist (Mühlethaler 1950, Frey-Wyssling 1950). Die Untersuchung der Kallose im Elektronenmikroskop wird die Entscheidung treffen, ob Struktur vorhanden ist und damit eine Zugehörigkeit zu den Schleimen in Erwägung gezogen werden kann. Nach meinen bisherigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den „Zellstoffbalken“ von *Caulerpa prolifera* kann ich nur feststellen, daß jegliche Struktur fehlt. Nach einer persönlichen Mitteilung von Mühlethaler besteht auch die Pollenschlauchkallose aus einer völlig homogenen Substanz. Bausteine sublichtmikroskopischer Größenordnung sind nicht zu erkennen. Es ist anzunehmen, daß es sich bei der Kallose um ein dreidimensionales Molekulargerüst handelt (Mühlethaler und Linskens 1956).

#### 5. Herkunft der Kallose

Es gibt zahlreiche Beobachtungen, die auf den lebenden Protoplasten als Bildungsstätte der Kallose hinweisen. Sie findet sich in Zellen sehr verschiedenen Alters und Entwicklungszustandes. Wachsende Pollenschläuche, Wurzelhaare und Pilzhypen können Kallose bilden, aber auch ausgewachsene Epidermiszellen (*Allium cepa*) oder Siebröhren, ja auch alternde

Lithocysten, Trichomzellen und Siebröhren bilden kurz vor dem Absterben noch Kallose. Theorien über die Herkunft der Kallose sind vielfach geäußert worden, hauptsächlich aber in bezug auf Siebröhrenkallose. Die dafür bekannten vier Anschauungsrichtungen seien mit ihren Verfechtern wiedergegeben.

1. Kallose ist ein Derivat oder Bestandteil der Zellwand: von Mohl (1882), Naegeli (1861), de Bary (1877), Wilhelm (1880), de Janczewski (1882), Oliver (1887), Lecomte (1888), Sykes (1908).

2. Kallose besitzt die Eigenschaften eines Eiweißes und stammt vom Protoplasma ab: Russow (1882), A. Fischer (1886), Strasburger (1891), Moore (1891).

3. Kallose ist ein Stärkeschleim: Gardiner (1885).

4. Kallose entsteht (in den Siebröhren) in zwei Etappen. Die primäre Kallose wird aus Zellulose gebildet, die später abgelagerte ist ein Derivat des Protoplasmas: Rendle (1889), Hill (1901).

Gegen die Eiweiß- und gegen die Stärkenatur der Kallose lassen sich Einwände erheben. Der Nachweis Russows (1882) mit einem Gemisch von Jod,  $\text{HNO}_3$  und  $\text{KClO}_3$ , mit dem er bei Siebröhrenkallose Eiweißnatur feststellte, ist genau so fragwürdig, wie es die ausführlichen Versuche Moores (1881) sind. Moore behandelte die Siebröhrenkallose von *Cucurbita pepo* mit Magensaft und Millons Reagens, ferner wandte er die Xanthoprotein- und die Biuretreaktion an. Alle von Moore erhaltenen schwach positiven Ergebnisse hat Schmidt (1917) nachgeprüft und widerlegen müssen. Schmidt vermutet, daß Moore Schleim mit Kallose verwechselt hat. Immerhin wäre es möglich, daß die Kallose einen ganz geringen Prozentsatz an stickstoffhaltigen Substanzen enthält, der vielleicht Schmidt entgangen ist. Wie von mir erwähnt wurde (Eschrich 1954), findet sich bei der Aufbereitung der Zystolithenkallose stets ein N-haltiger Rest von zirka 0,17%, der einer Extraktion mit Wasser, Alkohol, Äther, 1 n HCl, ja selbst 5%iger kalter NaOH energischen Widerstand leistet. Ich unternahm deshalb nochmals Verdauungsversuche mit Papain, Pepsin und Trypsin und verwendete dazu die Siebröhrenkallose der Blattstiele von *Victoria cruziana*.

Blattstiele von *Victoria cruziana* wurden sowohl frisch als auch in Carnoy fixiert, in 50- $\mu$ -Querschnitte zerlegt. Die Behandlung erfolgte mit:

1. Pepsin in Glyzerin gelöst + 1/10 n HCl  
Kontrolle: Glyzerin + 1/10 n HCl
2. Trypsin +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung  
Kontrolle:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung
3. Papain +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung + Cystein (Spur)  
Kontrolle:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung + Cystein (Spur)
4. Papain +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung + NaCN (Spur)  
Kontrolle:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung + NaCN (Spur)

Die Fermentaktivität der Lösungen 1–4 wurde mit gekochtem Hühnereiweiß nachgeprüft. Die bei 40° C durchgeführte Verdauung wurde spätestens 24 Stunden nach vollständiger Lösung des Hühnereiweißes abgebrochen.

Das Ergebnis: Die Lösungen 1, 2 und 4 zeigten unveränderte Kallosepolster, die auch nach der Fermentbehandlung in Cuoxam unlöslich blieben. Lösung 3 bewirkte bereits nach 18 Stunden eine vollständige Lösung der Kallose infolge bakterieller Zersetzung (vgl. D2). Ein Unterschied im

Verhalten der Kallose unfixierter und fixierter Siebröhren war nicht zu bemerken.

Auf Grund dieser Versuche ist es unwahrscheinlich, daß Kallose aus Eiweiß besteht. In z. Z. noch laufenden Versuchen soll festgestellt werden, ob Kallosematerial, das nach Walter (1920) mit fettlösenden Mitteln extrahiert wurde, von Trypsin verdaut wird. Vorläufig bleibt jedoch der einzige nachweisbare Baustein der Kallose d-Glukose (Mangin 1910, Eschrich 1954).

Was die Stärkenatur der Kallose anbetrifft, so schreibt Gardiner (1885): „... Die Gegenwart und das allmähliche Verschwinden von Siebröhren-Stärkekörnern sowie die Degeneration des plasmatischen Inhalts zu Schleim läßt nur wenig Zweifel, daß Kallose in Wahrheit von der Natur eines Stärkeschleimes ist...“ Schmidt (1917) hat nach 24stündiger Pytalinbehandlung bei 35° C keine Lösung der Kallose beobachten können. Weiterhin läßt sich gegen die Aussage Gardiners einwenden, daß viele kalloseführende Zellen (manche Siebröhren, Haare, Wurzelhaare, Exokarpzellen von Boraginaceen, z. T. Pilzhypphen, Lithocysten) keine Stärke enthalten.

Die Annahme, daß Kallose ähnlich wie die Zellwand ein Derivat des Protoplasmas ist, gewinnt damit an Wahrscheinlichkeit. Fraglich ist jedoch, bis zu welchem Grad die Kallose Bestandteil der Zellmembran wird. Plasmolysierbare Zellen zeigen stets ein Festhaften der Kallose an der Zellmembran (Wundsiebröhren, *Allium*-Epidermis). In manchen Fällen (Pilzhypphen, Pollenschläuche, Wurzelhaare) ist die Kallose sogar als innere Membranschicht zu bezeichnen. Aus diesem Grund ist die oben zitierte vierte Anschauungsrichtung: primäre Kallose (der Siebröhren) entsteht direkt aus der Zellwand der Siebplatten, nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen. Da diese Theorie nur auf anatomischen Feststellungen beruht, besteht kein Grund zu der Annahme, daß es sich bei primärer und sekundärer Kallose um chemisch oder strukturmäßig verschiedene Stoffe handelt. Andererseits ist der Beobachtung, daß bei fortschreitender Kallosevermehrung an der Siebplatte die Zellwanddicke abnimmt (Hill 1901), gegenüberzustellen, daß die ursprünglich gleich dicken Plattenränder zu Wülsten anschwellen (Eschrich 1953) und somit nur eine Zellulose-„Verdrängung“ nach dem Plattenrand zu stattfinden könnte (Abb. 2).

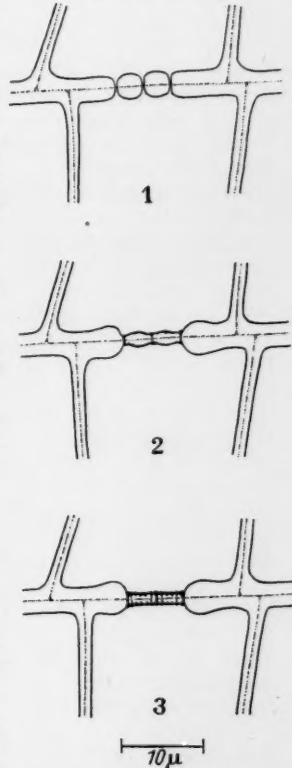


Abb. 2. Schematische Darstellung der Kallosebildung bei der Siebplattenentwicklung. Kallose schwarz. 1: Tüpfel; 2: Beginn der Kalloseproduktion. Im Bereich der Siebplatte verdünnt, an den Plattenrändern verdickt sich die Sekundärmembran; 3: Siebplatte kurz vor der Fertigstellung (nach Eschrich 1953).

## C. Über Kallosevorkommen in Pflanzen

### 1. Kallose in Siebröhren

Siebröhrenkallose ist in allen Gefäßpflanzen zu finden. Auch bei *Ophioglossum vulgatum* traf ich Siebröhrenkallose an, obwohl Poirault (1891a) bei den Siebröhren der Ophioglossaceen keine Kallose finden konnte. Die als „Siebröhren“ gedeuteten Stränge bei *Polytrichum* führen keine Kallose (Crafts 1939).

Die erste Andeutung für das Vorhandensein von Siebröhrenkallose machte Hartig (1851). Hanstein (1861) gab bekannt, daß das Auftreten von „Kallus“ ein sicherer Anzeiger für Siebröhren sei. Naegeli (1861) versuchte als erster die stoffliche Natur der Kallose zu ergründen, kam jedoch zu einem Fehlschluß, indem er sie mit dem Siebröhrenschleim in Zusammenhang brachte. Eine erste Zusammenfassung über das Kalloseproblem gab de Bary (1877) in seiner „Vergleichenden Anatomie“. — In der Folgezeit erschienen zahlreiche Arbeiten über Siebröhrenkallose. Bei diesen Untersuchungen waren vor allem Wilhelm (1880), de Janczewski (1882), Russow (1882), Fischer (1884 und 1886), Lecomte (1888) und Strasburger (1891) maßgebend beteiligt. Hill (1901) untersuchte die Kallose der Gymnospermen- (*Pinus*-) Siebröhren. — Eine zusammenfassende Darstellung gibt Schmidt (1917). Dabei geht er auf die Bedeutung der Kallose ein, vernachlässigt jedoch die Kallosevorkommen außerhalb der Siebröhren.

Das ständige Vorhandensein von Kallose in Siebröhren wurde in der Folgezeit als gegebene Tatsache genommen. Es sei deshalb nunmehr dargestellt, was über die Entstehung der Kallose, ihre Bildungs- und Ablagerungsorte und den Zustand der Siebröhren zur Zeit der Kallosebildung bekannt geworden ist.

Kallose findet sich in den Siebröhren aller Pflanzenorgane. Über ihr Vorhandensein in den Endigungen der Blattbündel liegen keine Darstellungen vor. Koch (1884) schreibt lediglich, daß die letzten, oft blind endigenden Siebröhrenglieder in den Bündelenden schaumigen Schleim und Zellkerne enthalten. Siebplatten sah er nicht.

Außer an den Siebplatten tritt Kallose auch an den Siebfeldern der Längswände auf. Die Tüpfelverbindungen zwischen Geleitzellen scheinen stets Kallosepolster zu besitzen. Nach Schmidt (1917) führen die gemeinsamen Siebtüpfel zwischen den *Cuscuta*-Haustorien und den Siebröhren der Wirtspflanze Kallose, haben aber keine Plasmaverbindungen.

Über die Bildung der Kallose stimmen die Ansichten weitgehend überein. Nach Wilhelm (1880) treten zuerst Kallosepfropfe in den Tüpfeln der späteren Siebplatte auf, die dann über die Oberfläche der Sekundärlamelle hervortreten und sich schließlich unter gleichzeitiger Öffnung der Tüpfel zu Poren mit benachbarten Kallosepfropfen zu einem Belag vereinigen. Hill (1901) findet die ersten Kallosespuren immer erst dann, wenn ein Plasmafaden, der die Siebplatte durchzieht, sichtbar wird. Die Kallose erscheint dann in Gestalt von dünnen Stäben, die sich meist von der Mittellamelle nach dem Zellinnern zu trichterförmig erweitern und den Plasmafaden umschließen. Es handelt sich demnach um Kalloseröhren. Hill (1901 und 1908) stellt sich die Bildung der primären Kallose so vor, daß um den Plasmafaden herum die Zellulose der Sekundärlamelle „zu Kallose degeneriert“. Die später gebildeten Kallosepolster sollen jedoch



vom Protoplasten neu gebildet sein. In der Tat scheint die Kallose sehr eng mit der Zellwand verknüpft zu sein, denn solange sich eine Siebzelle total plasmolysieren läßt, bleibt die Kallose an der Zellwand haften (Eschrich 1953). Die Ausbildung der Siebplattenkallose konnte ich an Wundsiebröhren von *Impatiens* beobachten (Eschrich 1953) (Abb. 2). Bereits vorhandene Tüpfelkanäle werden zuerst mit Kallose ausgekleidet. Mit zunehmender Kallosebildung nimmt die Dicke der Sekundärwand ab. Gleichzeitig schwellen aber die Plattenränder zu regelrechten Wülsten an, so daß man geneigt ist, an eine Verlagerung des Zellwandmaterials nach dem Plattenrand hin zu denken. Über die Auflösung der Mittellamelle in den Siebröhrentüpfeln liegen verschiedene Befunde vor (Huber 1939, Huber und Kolbe 1948, Volz 1952). Nach elektronenoptischen Befunden besitzen die Gymnospermen in der Regel noch Schließhäute in den Siebporen, die demnach besser als Siebtüpfel zu bezeichnen wären. Offene Porenkanäle finden sich bei abgeleiteten Formen (*Cucurbita*). *Ulmus* und *Robinia* führen am Plattenrand geschlossene Tüpfel, in der Plattenmitte offene Poren. *Populus* hat offene Poren in den Siebplatten, die Siebfelder der radialen Längswände dagegen besitzen Tüpfel mit Schließhäuten (Volz 1952). Außer den Siebporen treten in den Siebröhrenwänden auch Plasmodesmen bis herab zu einem Durchmesser von  $0,02 \mu$  auf, die geschlossen sind (Volz 1952).

Über das mengenmäßig unterschiedliche Auftreten von Kallose in den Siebröhren verschiedener Pflanzen bemerkt Crafts (1939) folgendes: Die Kalloseproduktion ist bei manchen Pflanzenarten, z. B. *Pinus*, *Picea*, *Cucurbita*, reichlich (hierzu gehört zweifellos eine große Reihe weiterer Phanerogamen), Gefäßkryptogamen bilden nur begrenzt Kallose aus. Bei Laubmoosen (*Polytrichum*) fehlt sie vollständig. Ein Unterschied in der Fähigkeit, Kallose zu bilden, besteht praktisch nicht. Deshalb lassen sich auch keine Beziehungen zwischen Kallosebildung und Form bzw. Funktion der Siebröhren knüpfen. Auch die Klassifizierung Fischers (1886) in:

1. Siebröhren mit gerinnbarem Saft (Cucurbitaceen),
2. Siebröhren mit Schleim (Urticaceen, Cannabinaceen, Chenopodiaceen, Crassulaceen, Oxalidaceen),
3. Siebröhren mit viel Stärke (Tropaeolaceen, Labiaten),

zeigt keinerlei Beziehung zur Kallosebildung.

Auch die Untersuchung über die verschiedenen Inhaltskörper der Siebröhren, wie Schleimkörper (Esa u 1947), die hauptsächlich in jungen Siebröhren auftreten und zusammen mit den Siebröhrenkernen verschwinden, oder „ausgestoßene Nucleolen“ (Esa u 1947), die Engard (1944) als globoide Schleimkörper beschrieb, lassen sich mit der Kallosebildung nicht in Zusammenhang bringen.

Besondere Beachtung verdient m. E. der Hinweis Fischers (1886), daß Siebröhrenkallose in verletzten Siebröhren reichlich vorhanden ist. Er fand, daß Pflanzen, die in toto durch Abbrühen fixiert wurden, nur geringste Spuren von Kallose in den ausgewachsenen Siebröhren führen, während bei der üblichen Fixierung, die ja immer mit einem Zerschneiden der Siebröhrenstränge verbunden ist, erheblich größere Kallosemengen auftreten.

Die Erscheinung der Kerndegeneration in Siebröhren ist mehrfach untersucht worden. Jedoch konnte stets festgestellt werden, daß Kallose bereits



vorhanden ist, bevor der Kern aufgelöst wird (Crafts 1933/34, Huber und Rouschal 1938, Eschrich 1953, Resch 1954).

Besonders eindrucksvoll ist die Bildungszeit der Kallose an Wundsiebbröhen zu verfolgen, da man hier durch die Wundsetzung die Bildung der Siebröhren auslösen kann (Kaan-Albest 1934, Crafts 1933/34, Eschrich 1953). Allerdings soll nach Resch (1954) der Kernzerfall bei Wundsiebbröhen später erfolgen als bei normalen Siebröhen.

Der Zeitpunkt des Beginns der Kalloseproduktion fällt auch nicht mit dem Eintritt der Siebröhren in den Zustand der Reife zusammen. Huber und Rouschal (1938) sprechen bei der „reifen“ Siebröhre von einem „präletalen“ oder „prämortalen“ Zustand des Protoplasten. Sie finden, daß bei beginnendem Kernzerfall ein Maximum an Permeabilität erreicht wird, zu welchem Zeitpunkt jedoch schon erhebliche Mengen an Kallose produziert worden sind. Dieser Zustand kann u. U. erst 6 Wochen nach Beginn der Kalloseproduktion eintreten (Eschrich 1953).

Eine vermehrte Bildung von Kallose kann in Siebröhen künstlich hervorgerufen werden. Schumacher (1930) beobachtete, daß Eosin, in die Siebröhen eingeleitet, die Ausbildung mächtiger Kallosepolster an den Siebplatten verursacht. Und zwar treten diese Kalloseverschlüsse immer in einer gewissen Entfernung von der Farbstoffspitze auf. Die Siebröhre geht später zugrunde. Diese „Eosin-Reaktion“ Schumachers zeigt, daß die Kallosebildung mit dem lebenden Protoplasten im Zusammenhang stehen muß. Es genügen anscheinend geringste Mengen von Kalium-Eosin, Mengen, die gerade eine Fluoreszenz im UV-Licht zeigen, um die Kallosebildung hervorzurufen (Eschrich 1953).

Über die vermehrte Kalloseproduktion infolge Infektion mit Blattrollvirus bei der Kartoffel soll weiter unten berichtet werden. Durch Virusinfektion kann auch der umgekehrte Fall, die Unterbindung der Kallosebildung, ausgelöst werden. Hierbei tritt jedoch Phloemnekrose ein (Esau 1935).

Alle diese Erscheinungen verursachen im Endeffekt stets ein Absterben der Siebröhen. Vorher aber scheinen die genannten Faktoren einen quantitativen Einfluß auf die Kallosebildung im Sinne einer Anregung oder einer Blockierung auszuüben.

Die gleiche Erscheinung vermehrter Kallosebildung tritt uns im Winterzustand der Siebröhen entgegen. Bei annuellen Pflanzen werden im allgemeinen die Siebplatten und Siebfelder im Spätherbst (oft aber schon nach dem Fruchtfall) durch dicke Kallosepolster unwegsam gemacht. Die verrottenden Pflanzenteile verlieren ihre Kallose durch Bakterienfraß, noch bevor die Zellulose abgebaut wird.

Bei zweijährigen oder perennierenden Pflanzen tritt die gleiche Blockierung der Siebplatten ein. Meist obliterieren die Siebröhen im Herbst. Sie verlieren ihren plasmatischen Inhalt (Fischer 1886) oder füllen sich mit Gas (Esau 1947). Für eine Anzahl von Pflanzen jedoch ist nachgewiesen, daß ihre Siebröhen zwei oder mehr Jahre funktionstüchtig bleiben. De Janczewski (1878) beobachtete an *Phragmites*-Rhizomen, daß die Siebröhrenkallose im zeitigen Frühjahr verschwindet, wenn man das Rhizom im warmen Zimmer kultiviert. *Tilia*-Siebröhen sollen sogar vier Jahre funktionstüchtig bleiben (de Janczewski 1881, Esau 1948). Lecomte (1889) war der Meinung, daß die Reaktivierung der Siebröhen für perennierende Monocotylen charakteristisch sei; auch für *Rosa* gab er eine

zweijährige Funktionsdauer an. Lodewick (1928) fand bei *Liriodendron* zweijährige Siebröhren. Eine ausführliche Darstellung der Reaktivierung des Phloems gibt Esau (1948) für *Vitis vinifera*. Sie unterscheidet vorläufige Kalloseverschlüsse (dormancy, provisional callus), die nur zeitweilig (während des Winters) die Siebporen bedecken, und endgültige Kalloseverschlüsse (definitive callus), die auftreten, wenn die Siebröhre ihre Aufgabe erfüllt hat und außer Funktion gesetzt wird.

## 2. Kallose in den „Siebröhren“ der Algen

Die erste Notiz über das mögliche Vorkommen von Kallose in Algen gibt Will (1884). Er fand, daß die Siebplatten von *Macrocystis* und *Nereocystis* in einigen Fällen von einer körnigen Substanz bedeckt waren, die sich mit Jod gelb färbte. Für ein zweites Bauelement des axialen Stranges der Algen, die Siebhyphen (trumpet hyphae), die Wille (1885) für



Abb. 3. Siebhyphe (trumpet hyphae) von *Macrocystis pyrifera*. Kallose schwarz (nach Oliver 1887). (750 $\times$ )

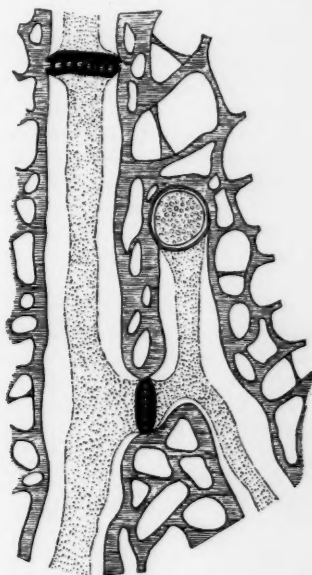


Abb. 4. Siebröhren von *Macrocystis pyrifera*. Kallose schwarz (nach Oliver 1887). (900 $\times$ )

die Rotalge *Cystoclonium purpurascens* (Huds.) Kütz. und für *Chorda filum*, *Laminaria digitata*, *Laminaria clustoni*, *Laminaria saccharina* und *Fucus*-Arten beschrieb, ist die Leitfunktion noch nicht erwiesen, doch sehr wahrscheinlich. Oltmanns (1904) unterscheidet „Siebhyphen“ (= „trumpet hyphae“) (Abb. 3) ohne perforierte Querwände von „Siebzellen“ oder „Siebröhren“ (Abb. 4), die nach Oliver (1887) nur bei *Macrocystis* und *Nereocystis* regelmäßig neben Siebhyphen zu finden sind. Oliver (1887) fand als erster, daß beide Elemente Kallose neben Zellulose enthalten und obliterieren können. Ausführlich berichtet Sykes (1908) über die Kallose

der Algensiebelelemente. Durch Farbreaktionen mit Londonblau, Wasserblau, Kongorot und Thionin gewann Sykes den Eindruck, als ob Kallose eine schleimige, hydratisierte Form von Zellulose sei. Sie beobachtete, daß *Laminaria digitata* und *Laminaria saccharina* im Winter größere Kallosepolster besitzen als im Sommer und daß eine Färbung mit den oben genannten Farbstoffen nur nach vorheriger Quellung zustande kommt. (Mit Resorzinblau bekam ich bei *Chorda-filum*-Siebhyphen eine klare Kallosereaktion. Ref.) Sykes schreibt weiter, daß die Kallose nicht nur an den Siebplatten gebildet werde, sondern oft auch die Längswände bedecke. Die Siebröhren von *Macrocystis* sollen sich nach Oltmanns (1904) dadurch von Phanerogamen-Siebröhren unterscheiden, daß sie ihre Zellkerne bis zur Obliteration behalten. Ein ausführliches Verzeichnis der älteren Literatur findet sich bei Sykes (1908).

Die von Moore (1891) bearbeiteten Kallose-„stoppers“ der Rotalge *Ballia callitricha* Ag. stellen halbkugelige bis linsenförmige Beläge dar, die die Querwände länglicher Zellen beiderseits bedecken. Diese Zellen sind zu einer Zellreihe vereint, die den Thallusast axial durchläuft und z. T. auch in Fiederästen auftritt. Abbildungen finden sich bei Archer (1880). Ob es sich hier um Kallosebeläge handelt, ist nicht sicher, da Moores Kallosenachweise von Schmidt (1917) widerlegt wurden (vgl. S. 498). Denkbar wäre jedoch, daß diese „stoppers“ eine ähnliche Funktion wie der Siebröhrenkallus haben. Lage und Aussehen der stopper-Zellreihen lassen eine Leitfunktion vermuten.

### 3. Kallose an jungen Tracheiden

Außerhalb der Siebröhren wurde Kallose zum erstenmal von Gardiner (1885) entdeckt. Durch Anfärben mit Corallin-Soda und Hofmanns-

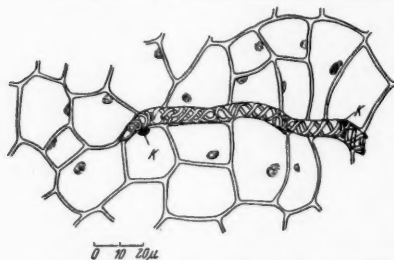


Abb. 5. Tracheidenendigung in der Gynobasis von *Lindelfia spectabilis* mit zwei Kallosepolstern (K).

Blau konnte er nachweisen, daß an den Spitzen junger Tracheiden Kallosebeläge auftreten können. Derartige sah er bei *Sambucus*-Wurzeln und *Vicia*-Stengeln.

Um dies nachzuprüfen, habe ich eine Zeitlang vergeblich versucht, Kallose in Tracheidenendigungen von Wurzelspitzen und Blättern anzutreffen. Auch die bei Verletzung der Leitbündel neugebildeten Wundtracheiden von *Impatiens*-Arten zeigten keine Kallosepolster. Durch Zufall fand ich jedoch im Parenchymgewebe der Gynobasis von

*Lindelfia spectabilis* (Boraginaceae) Tracheidenendigungen, die kleine, halbkugelige Kallosepolster aufwiesen. Diese Polster (Abb. 5) liegen meist in der Nähe eines der beiden spitzen Enden der Tracheidenwand außen auf, so daß sie hauptsächlich in der benachbarten Parenchymzelle sichtbar sind.

### 4. Kallose in Milchröhren

Spencer (1939) stellte fest, daß bei *Hevea brasiliensis* die Milchröhren in Trenngeweben des Blattstieles durchweg mit dicken Kallosepfropfen

verschlossen sind. Schneidet man die Blätter im Trenngewebe ab, so tritt weder am Blattstiel noch am Stamm Milchsaft aus der Wunde. Die anatomische Untersuchung ergab, daß besonders an den Verzweigungsstellen der Milchröhren Kallose das gesamte Röhrenlumen ausfüllt (Abb. 6). Auch in den Stielen der Fiederblätter fand Spencer Kallose. Bei jungen Blättern fehlte sie. Spencer meint, daß durch den Kalloseverschluß ein Stofftransport zumindest über weite Strecken unterbunden würde. Auch in *Ficus*-Milchröhren tritt Kallose auf, wie Currier (persönliche Mitteilung) mit der Anilinblaufluoreszenz nachweisen konnte. Außer bei *Ficus elastica* (Taf. 1, Abb. 9) fand ich in den Milchröhren der *Spatha* von *Alocasia macrorrhiza* Kallose.

Obwohl Milchröhren bei Monocotylen nur für Musaceen und Araceen beschrieben worden sind (Haberlandt 1904), so gehören im weiteren Sinne sicher auch die „laticiferous cells“ der *Allium-cepa*-Schuppe, wie sie von Rendle (1889) beschrieben wurden, hierher. Hanstein (1861) bezeichnete diese Zellreihen als „Schlauchreihen“. Gelegentlich taucht auch der Name „Exkretionssäcke“ auf. Es handelt sich um Reihen parenchymatischer Zellen, die in den Blättern etwa in der Ebene der dritten subepidermalen Schicht verlaufen. Am Schuppengrund bilden sie Anastomosen untereinander aus, in den grünen Blatteilen liegen sie unter den Palisadenschichten und endigen blind. Eine Verbindung zum Leitbündelsystem besteht nicht. Die Zellen sind mit einem in Alkohol löslichen, körnigen Milchsaft gefüllt, der beim Anschneiden der Zwiebel ausläuft. Rendle (1889) beobachtete knotige Polster auf beiden Seiten der nach seiner Meinung nicht perforierten Querwände. Diese Polster geben Corallin-Soda-Reaktion (Abb. 7). Mit Resorzinblau habe ich stets eine einwandfreie Kallosereaktion bekommen.

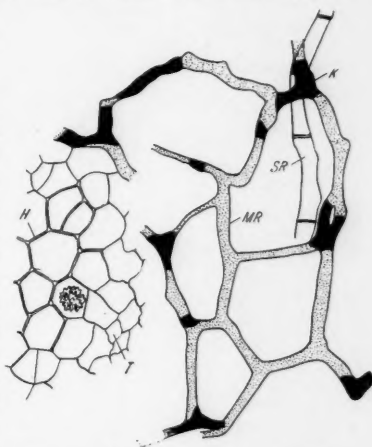


Abb. 6. Milchröhren aus der Blattstielbasis von *Hevea brasiliensis*. K = Kallose, SR = Siebröhre, MR = Milchröhren, H = verholztes Parenchym, T = Trenngewebe, ohne Maßstab (nach Spencer 1939).

### 5. Kallose bei *Caulerpa prolifera*

Die noch in der neuesten botanischen Lehrbuchliteratur (Harder 1951, p. 319) vertretene Meinung, daß die „Zellulosebalken“ im Innern der *Caulerpa*-Pflanzen zur Aussteifung des Thallus dienen, dürfte auf eine Veröffentlichung Naegeli (1844) zurückgehen. Naegeli vergleicht die dickwandigen *Caulerpa*-Schläuche und ihre „Stützen“ mit den Schrauben- und Netzgefäßen höherer Pflanzen.

Noll (1888) zeigte dagegen, daß die Alge an der Luft alsbald kollabiert, wobei sich die „Zellulose“-Balken als schwache „Stützen“ erwiesen. Er suchte ihre Funktion weniger auf mechanischem als auf physiologischem Gebiet und konnte nachweisen, daß diese Fasern leicht passierbare Bahnen für den

Stoffaustausch zwischen dem Pflanzeninnern und dem Außenmedium darstellen.

Über die chemische Zusammensetzung des *Caulerpa*-Membranschlauches schrieb Correns (1894), daß es sich weder um Zellulose, Kallose, Pilzzellulose (oder Chitin) noch um Reservezellulose handeln könne. Neuerdings sind von Steward und Mühlethaler (1953) elektronenoptische Untersuchungen an der Schlauchwand von Valoniaceen gemacht worden. Danach

scheint die Ablagerung der Zellstoff-fibrillen in ganz anderer Weise vor sich zu gehen, als es bei höheren Pflanzen beim Intussusceptionswachstum der Fall ist. Offensichtlich läßt sich daher aus dem negativen Ergebnis bestimmter Adsorptionsfärbungen noch kein sicherer Schluß auf das Nichtvorhandensein von Zellulose ziehen. Andererseits sei erwähnt, daß unter der großen Zahl verschiedener Polysaccharide, die aus Meeresalgen gewonnen wurden, auch eine „Algenzellulose“ sehr weit verbreitet zu sein scheint (Mori 1953). Diese gleicht im Aufbau der Zellulose höherer Pflanzen, besitzt jedoch Zellulosemoleküle mit nur 160 Glukoseeinheiten. Demzufolge wäre auch bei den Siphonales das Vorhandensein einer niedermolekularen Zellulose nicht ausgeschlossen.

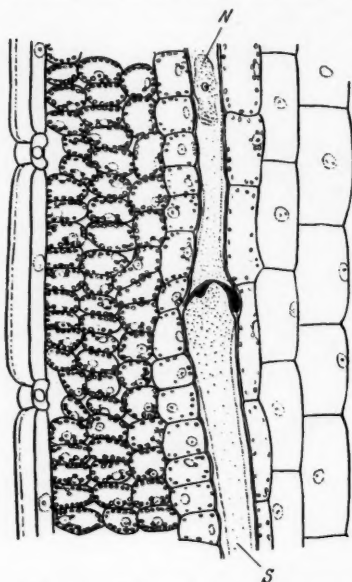


Abb. 7. Längsschnitt durch ein *Allium-cepa*-Blatt. Kallosebeläge (schwarz) an der Querwand der „Schlauchzelle“ (S), N = Kern (nach Rendle 1889). (200 $\times$ )

Die Beteiligung der Kallose an der Membranbildung bei *Caulerpa* beschrieb zuerst Mirande (1913 a). Mirande war als Schüler Mangins mit den Kallosereaktionen vertraut. Er stellte fest, daß die Membran keine Zellulose enthält, sondern aus Pektinstoffen und Kallose besteht. Beim Herauslösen des Pektins mit kochender (wahrscheinlich

stark verdünnter)  $\text{HNO}_3$  und  $\text{NH}_3$ -Wasser wurde der Rest, die Kallose, so verändert, daß sie nun in Cuoxam löslich war. In einer ausführlichen Arbeit beschreibt Mirande (1913 b) die Membran von *Caulerpa* wie folgt: Die Schlauchmembran und die „Querbalken“ (trabécules membraneux) bestehen aus Lamellen. Außen liegt auf dem Schlauch eine gegen die Einwirkung von Chemikalien und Farbstoffen träge reagierende Kutikula. Die darunter befindliche Membran gibt Kallosereaktionen, Zellulose- und Hydrozellulosereaktionen sprechen nicht an. Die Querbalken stellen ein primäres Filament dar, das sekundär von einer Wandsubstanz umhüllt wird. Ihre Aufgabe besteht darin, die riesige Schlauchzelle mit Nährstoffen zu versorgen. An den Insertionsstellen der Querbalken in der Schlauchwand finden sich trichterförmige Vertiefungen, in denen häufig parasitische Algen festsitzen oder gar in die Balken hineinwachsen. Mirande nimmt sodann eine Ein-

teilung der *Siphonales* nach der Membranzusammensetzung vor und unterscheidet.

1. Algenmembranen ohne Zellulose, aber mit Kallose und Pektinen: Udoteen,
2. Zellulose vorhanden, daneben aber auch Kallose und Pektin: Bryopsidaceen, Derbesiaceen, Codiaceen,
3. Keine Kallose vorhanden, dafür aber Zellulose und Pektin: Vaucheria-ceen, Phyllosiphoniaceen.

Bei genügend dünnen Querschnitten von *Caulerpa*-„Rhizomen“ konnte ich feststellen, daß die Querbalken im Innern einen Kanal führen, der an der Trichtermündung äußerst eng ist, sich dann aber plötzlich nach dem

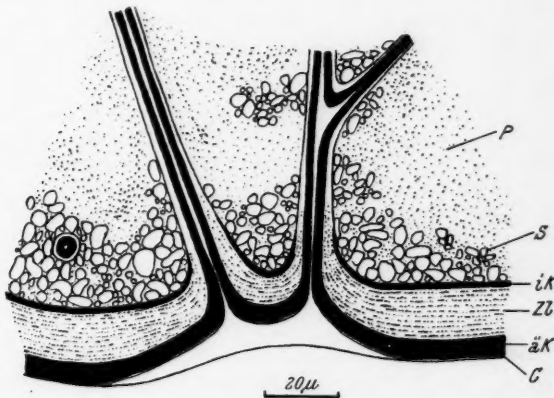


Abb. 8. Querschnitt durch die Thallusachse von *Caulerpa prolifera*. Kallose schwarz. P = Plasma, S = Stärke, Zl = Zwischenlamellen, C = Kutikula, iK = innere Kallozelamelle, äK = äußere Kallozelamelle.

Schlauchinnern zu erweitert. Die Querbalken bilden wahrscheinlich ein reich verästelt, räumlich angeordnetes „Adernetz“. Die den Kanal umkleidende Röhre, also die eigentliche Querbalkenssubstanz, färbt sich mit Resorzinblau wie Kallose. An der Trichtermündung erweitert sich diese Kalloseröhre und verschmilzt mit der den gesamten Organismus umkleidenden Kalloseröhre (äK), die Bestandteil der Algenmembran ist. Oft treten noch einige dünne Kallozelamellen (iK) in der Membranröhre auf, die durch Schichten voneinander getrennt sind, die mit Resorzinblau keine Blaufärbung ergeben (Abb. 8 und Taf. 1, Abb. 3). Das elektronenmikroskopische Bild eines Querbalkens läßt keinerlei Struktur in der Kallose erkennen.

#### 6. Kallose in Pilzen

Zalewski (1883) fand zwischen den jungen Konidien von *Cystopus candidus* „Zelluloseleisten“, die sich mit Chlorzinkjod gelbrosa färbten und in Wasser stark quollen. Im gequollenen Zustand stellt eine solche Leiste eine Art Gallerte dar, die sich in Wasser allmählich auflöst und die Konidien freigibt. Nach Mangin (1891) besteht diese „Zelluloseleiste“ aus Kallose; er sagt, daß sie nur während des Ablösungsvorganges der Konidien



gebildet wird<sup>4</sup>. Im einzelnen geht der Abschnürungsvorgang so vor sich, daß in einer bestimmten Entfernung vom Hyphenende ein Kallosering gebildet wird, der das Hypheninnere verengt. Während der Ausbildung der Konidie verengt sich der Kallosering immer mehr, bis er zu einer abschließenden Trennwand zusammengewachsen ist, die sich schalenförmig der Konidienrundung anpaßt. Zwischen Kallose und Konidie „schiebt“ sich sodann eine zellulose Wandschicht (die Membran der Konidie), und die Kallose beginnt sich in Wasser ohne vorausgehende Quellung aufzulösen. Sobald die Kallose die Eigenschaft annimmt, sich in Wasser zu lösen, versagen die Färbungen mit „bleus solubles“ (gemeint sind die wasserlöslichen blauen Triaminotriphenylmethanfarbstoffe).

In der gleichen Arbeit beschreibt Mangin Kallosepfropfen, die unregelmäßig verteilt im Innern der Hyphen von *Peronospora* sp. sp. vorkommen und durch Zusammenfließen zu einem Trichter den Querschnitt der Hyphe verengen oder gar verschließen können. Von diesen unregelmäßigen Pfropfen (bouchons) unterscheidet er die beim gleichen Objekt auftretenden Scheidewände (cloisons) aus Zellulose mit beidseitiger starker Kalloseauflagerung. Ein Auftreten von derartigen Kallosepfropfen und kallosebedeckten Scheidewänden kann ich für konidienbildendes Mycel von *Phytophthora infestans* bestätigen (Abb. 9–12). Besonders häufig waren hier auch die Hyphenspitzen mit Kallose ausgefüllt. Abgestorbene Hyphenteile wurden von lebenden fast stets durch einen dicken Kallosepfropf isoliert. Es sei jedoch hier darauf hingewiesen, daß eigentümlicherweise immer nur einige Hyphen aus einem Mycel (der gleichen Petrischale!) mit Kallose versehen sind. Direkt daneben liegen wiederum Hyphen, die überhaupt keine Kallose aufweisen.

Greis (1937) berichtet über das Auftreten eines „Kallus“ an den Querwänden der dikaryotischen Fruchtkörperhyphen von *Tulostoma mammosum* Fries. (*Basidiomycetes*) kurz vor dem Absterben der Hyphen oder der Bildung des Capillitiums, wobei gleichzeitig Pigment eingelagert wird.

In einer weiteren Arbeit erwähnt Mangin (1895), daß Oogonien und Oozygoten oft mit Kallosemassen angefüllt sind oder im Innern einen Kallosering besitzen.

Farr (1954) stellt das Auftreten von Kallose in der Innenwand der Conidiophoren von *Aspergillus niger* und *Aspergillus carbonensis* fest.

Bei der Innenwand der *Phytophthora*-Konidien und bei Sporangien von *Mucor mucedo* konnte ich vereinzelt Kallosereaktion bekommen.

Diesen als Polster, Wülste oder Scheidewände ausgebildeten Kallosevorkommen bei Pilzen stehen Beobachtungen Mangins gegenüber, wonach ganze Hyphenwände Kallose enthalten oder gar völlig aus Kallose bestehen sollen. Da Mangin derartige Kallose zur Analyse benutzte, ist es nötig, näher auf diese von Schmidt (1917) als zweifelhaft dargestellten Befunde einzugehen.

Mangin (1890) behauptete, Kallose sei bei Pilzen weit verbreitet und bilde einen ständigen Begleiter der Pilzmembran. Er schloß dies aus der Färbbarkeit der meisten Pilzmembranen — allerdings meist erst nach längerer Säuren- oder Laugenbehandlung — mit Farbstoffen der Benzidinreihe und der Triphenylaminmethan-Gruppe. Mangin zählte die Kallose zu den drei „substances fondamentales“ der Membran und stellte sie damit

<sup>4</sup> Es scheint sich also nur um einen Teil des Disjunctors zu handeln.



gleichbedeutend neben Zellulose und Pektine. Auf Grund dieser Voraussetzung hatte er natürlich genügend „Kallose“ in Form von Pilzmembranen für eine Analyse zur Verfügung.

Schon vor ihm hatte Hoffmeister (1888) Steinpilze verarbeitet, wobei er ein weißes Pulver — die Grundsubstanz der Pilzzellwände — erhielt, das weder Asche

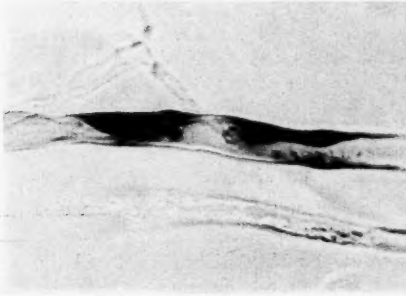


Abb. 9.

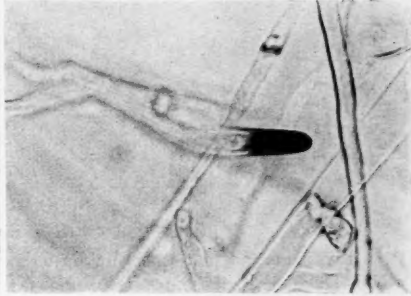


Abb. 10.

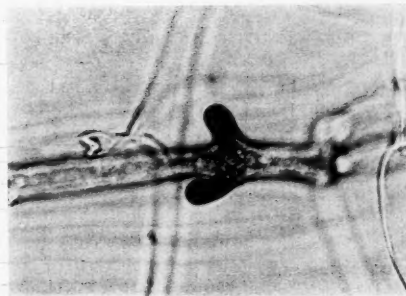


Abb. 11.

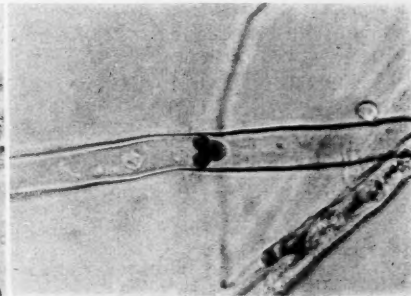


Abb. 12.

Abb. 9—12. Hyphen von *Phytophthora infestans*. (1015X.) 9: Kallosekalotten, in der Mitte eine Hyphe. 10: Kallose in einer Hyphenspitze. 11: Kallose in den Spitzen von zwei Seitenhyphen. 12: Trichterförmige Hyphenquerwand, beidseitig mit Kallose bedeckt.

hinterließ noch Stickstoff enthielt, jedoch zum Unterschied von Zellulose in Cuoxam unlöslich war. Mangin griff 1894 dieses Verfahren auf und erhielt aus *Polyporus*-Arten eine Substanz, die sich mit Anilinblau und allen damals bekannten „Kallose“-Farbstoffen färbte. Nach langem Kochen mit 4—5%iger  $H_2SO_4$  erhielt er eine braune Flüssigkeit, die mit  $BaCO_3$  neutralisiert eine sirupartige Konsistenz annahm. Mit Phenylhydrazin erhielt er daraus zwei Osazone, die er als Galaktosazon (Fp. 193°) und Rhamnosazon (Fp. 182—183°) identifizierte. Mangin glaubte, Kallose verarbeitet zu haben. Ein Jahr vor ihm veröffentlichte Winterstein (1895) eine Analyse von *Boletus-edulis*- und *Polyporus*-sp.-Mycel. Er erhielt jedoch nur Glukosazon (Fp. 204°). Winterstein stellte fest, daß Pilzmycel-Hydrolysate nur 65% Glukose enthielten, während Baumwolle bei der gleichen Verarbeitung 93,9% Glukose lieferte. Die gereinigte Pilzmembransubstanz bezeichnete er

als Pilzzellulose, sie war in Cuoxam unlöslich. Sehr ähnlich verfuhr Gilson (1895) bei der Untersuchung des Mycels von *Claviceps-purpurea*-Sclerotien und *Agaricus campestris*. Das von ihm erhaltene Hydrolysenprodukt, das in Cuoxam ebenfalls unlöslich war und keine Chlorzinkjodreaktion gab, nannte er Mycosin.

Dieses Mycosin (Methylglukosamin) ist nach Van Wisselingh (1898) das Hydrolysenprodukt des Pilzchitins. Die gleiche Substanz hätte Mangin erhalten müssen, als er seine Mycelien hydrolysierte. Deshalb war Van Wisselingh der Meinung, daß Mangin das Chitin der Pilzzellwände mit Kallose verwechselt hat. Einen Beweis sah er darin, daß sich das Manginsche Pilzmaterial in heißem Glycerin (500° C) nicht vollständig löste (Kallose hätte schon bei 280° C aufgelöst sein müssen). Der Rückstand löste sich nur in heißer konzentrierter KOH und lieferte Mycosin. Mangin konnte also zumindest keine reine Kallose verarbeitet haben.

Inzwischen hatte Tanret (1897) bei *Claviceps purpurea*, *Boletus edulis*, *Polyporus officinalis* und *Aspergillus niger* unter fast gleichen Bedingungen eine Substanz isoliert, die er Fongose nannte.

Das Hin und Her über die Bezeichnung des fraglichen Pilzstoffes, ob Chitin, Kallose oder Fongose, wollte Mangin (1910) mit einer Klärung durch zwingende Analysen beenden. Er analysierte mit Arnaud zusammen das Mycel des Wurzelparasiten *Bornetina corium* und fand schließlich, daß der einzige Bestandteil des Hydrolysates Glukose ist. Spuren von Stickstoff führte er auf Plasmareste zurück. Da das Produkt in Cuoxam unlöslich war, bestand er darauf, es Kallose zu nennen.

Dessenungeachtet erschien im gleichen Jahr eine Erwiderung Tanrets (1910), der Mangin einen Widerspruch in bezug auf die Löslichkeit in verdünnten Alkaliläugen nachweist (vgl. S. 495) und auf seiner Anschauung beharrt. Fongose sei etwas anderes als Kallose.

Ein Ergebnis wurde nicht erzielt. Es ist bis heute also nicht zu entscheiden, ob tatsächlich die Kallose eine fundamentale Rolle im Aufbau der Pilzmembran innehat. Nach Frey (1950) kann nur festgestellt werden, daß es zwei große Gruppen von Pilzmembranen gibt, nämlich diejenigen, die Zellulose enthalten, und diejenigen, die Chitin enthalten. Beide Stoffe nebeneinander kommen nur selten vor (Nabel 1959).

Nach Schmidt (1917) und Eschrich (1954) ist es unwahrscheinlich, daß die Kallose in Pilzmembranen mit den sonstigen Kallosevorkommen identisch ist. Die chemische Analyse bedeutet nichts angesichts der Tatsache, daß Zellulose die gleichen Grundbausteine besitzt wie Kallose. Die Kallose im eigentlichen Sinne erscheint stets in wohl umgrenzten Massen, Polstern, Belägen oder in Lamellen. Mangin steht allein mit seiner Ansicht, daß Kallose auch mit anderen Membransubstanzen, wie z. B. Zellulose und Chitin, vermischt sein kann. Wohl mehren sich die Befunde, daß Kallose geschlossene Membranschichten bilden könne, wie das in Pilzhypen, Pollenschläuchen, Wurzelhaaren, bei *Caulerpa prolifera* und auch in Siebröhren beobachtet wurde. Immer aber läßt sich dabei zumindest eine äußere Membran wahrnehmen, die keine Kallosereaktion gibt<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Allerdings fand Thomas (1930) bei *Sclerotinia* eine äußere Membran, die seiner Meinung nach aus Kallose, Fettsäuren und Phosphorsäure besteht. Bei der Analyse benutzte er jedoch ganze Mycelien; es besteht also kein Grund zur Annahme, daß die gefundenen Bestandteile aus der Außenwand stammen.

Aus diesen Gründen ist die nun folgende Liste von Källosevorkommen bei Pilzen, wie sie Mangin (1890) aufstellte, mit Zurückhaltung zu betrachten.

Phycomyceten: Peronosporaceen: *Cystopus candidus*, *Cystopus cubicus*, *Peronospora viticola*, *Peronospora Schachtii*.

Saprolegniaceen: *Achlya*, *Dictyuchus*.

Mucoraceen: *Mucor* sp., *Phycomyces*, *Rhizopus*, *Pilobolus*, *Chaetocladium*.

Ascomyceten: *Bulgaria inquinans*, *Ascobolus furfuraceus*, *Oidium*, *Rhytisma acerinum*, *Rhytisma onobrychis*, *Penicillium glaucum*, *Saccharomyces* sp.

Basidiomyceten: *Corticium*, *Polyporus igniarius*, *Polyporus tuberosus*, *Dedalea quercina* — Uredineen.

Bei lichenisierten Pilzen der Flechtengattungen: *Usnea*, *Ramalina*, *Physcia*, *Cetraria*, *Umbilicaria*.

## 7. Källose in Antheren, Pollenmutterzellen, Pollenkörnern und Pollenschläuchen

Die ersten Beschreibungen von Källosevorkommen im männlichen Gametophyten stammen von Mangin (1889 a, b). Er stellte an Antherenquerschnitten alkoholfixierter Staubbeutel von *Digitalis purpurea* fest, daß kurz nach der Tetradenbildung die alle vier Pollenzellen einhüllende Membran der PMZ aus Källose besteht. Sobald sich die Pollenkörner voneinander lösen, ist keine Källose mehr nachzuweisen. Die gleiche Erscheinung beobachtete er bei *Asparagus officinalis*, *Lycium europaeum*, *Althaea rosea*, *Cephalaria tartarica*, *Tropaeolum majus* und *Campanula rapunculus*.

Farr (1916) vertrat die Ansicht, daß bei der Tetradenteilung die Källose durch den Turgordruck der PMZ zwischen die Mikrosporen eingelagert wird. Er bezeichnet die Källose als gelatinöse Masse, die durch Quellung der PMZ-Membran entsteht. Strasburger und Koernicke (1923) schreiben dazu (p. 590): Sobald die Pollen (von *Hemerocallis*) Struktur annehmen und die Zellwände der PMZ verquellen, tritt Anilinblaufärbung positiv auf, später ist wieder Zellulose nachweisbar.

In einer umfangreichen Arbeit vertritt Mühl-dorf (1941) die Meinung, daß die PMZ-Källose als Reservestoff für die Weiterentwicklung der Mikrosporen benötigt wird. Er untersuchte 307 Pflanzenarten und stellte fest, daß die PMZ-Källose bei Angiospermen allgemein verbreitet ist. Die Dauer des Auftretens von PMZ-Källose ist jedoch nur kurz: Zunächst verdickt sich die PMZ-Membran stark und gibt Kallosereaktion. (Nach Mühl-dorf handelt es sich bei der Källose um eine „erstarrte bröckelige Gallerte“.) Während der Tetradenteilung bleibt die Källosehülle erhalten. Unmittelbar nach Abtrennung der Mikrosporen scheiden diese eine Källosehülle ab. Die stärkste Kallosereaktion tritt zu dem Zeitpunkt ein, an dem die Exine sich zu bilden beginnt. Über den Abbau der Källosehülle führt Mühl-dorf folgendes an: „Die Verflüssigung der Källose beginnt an der Oberfläche der Tetraden und schreitet nach innen fort.“ Und an anderer Stelle: „Der Kallosestoff wird von den wachsenden Mikrosporen als Nahrung verbraucht.“ (Warum beginnt dann die Verflüssigung nicht von innen? Ref.)

Nach meinen Beobachtungen an Antheren von *Campanula rapunculus* gibt die Membran der PMZ von Anfang an keine Chlorzinkiodreaktion. Zellulose scheint also abwesend zu sein. Unmittelbar nach der Tetradenbildung

verdicken sich sowohl die äußeren als auch die zwischen den vier Tochterzellen liegenden Membranpartien der ursprünglichen PMZ. Alle diese Membranpartien färben sich mit Resorzinblau leuchtend blau (Taf. 1, Abb. 6). Nach Ausbildung der Exine lösen sich die Pollen aus der Kallose-„Matrix“, das Membrangerüst der PMZ liegt frei im Pollensack und ist später in Fetzen zerteilt oder unregelmäßig verklumpt zwischen den Pollenkörnern oder an einer Pollensackwand darstellbar, zum größten Teil jedoch aufgelöst. Von einer Umwandlung in Zellulose konnte ich nichts bemerken. Die Antherenwandung der reifen Anthere von *Cucurbita pepo* enthält ganze Zellschichten, die mit Kallose gefüllt sind. Hauptsächlich findet sich Kallose an der Innenwand der Endotheciumzellen.

Bei der Untersuchung der Membranen des reifen Pollenkorns (*Cytisus laburnum*, *Spartium junceum*, *Valeriana phu*, *Pinus* sp., *Scirpus* sp., *Carex* sp.) fand Mangin (1889 und 1892), daß

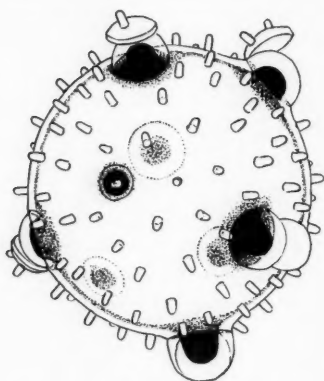


Abb. 13. Pollenkorn von *Cucurbita pepo*, 120  $\mu$  Durchmesser, mit 9 Keimporen. Die Keimhöfe sind mit Kallose (schwarz) angefüllt.

die zwischen Intine und Exine unter den Keimporen oder -alten liegenden Häufchen aus Pektinen bestehen. Diese Stellen quellen bei der Keimung, die übrige Intine bleibt ungequollen. Bei manchen Arten bestehen diese Häufchen aus Kallose. Bei *Pinus silvestris* ist die äußerste Schicht der Intine nur unter den Häufchen verdickt (Strasburger und Koernicke 1923). Diese Kalotte soll aus Kallose und Pektinstoffen bestehen. Auf der Innenseite der Intine fand Mangin bei allen Arten Kalloseanhäufungen, und zwar hauptsächlich unter den Keimporen. Nach meinen Beobachtungen an keimenden Pollen von *Galanthus nivalis* bildet sich innerhalb des Schlauches ein ringförmiger Kallosewulst rund um die Keimpore. Diesen Kalloserring passiert der protoplasmatische Inhalt des Pollenkorns beim Auswachsen des Schlauches.

Besonders deutlich ist die Kallose der Keimporen in den reifen Pollen von *Cucurbita pepo* zu sehen. Die von Sachs (1870) abgebildeten „Zellstoffhaufen“<sup>6</sup>, die das Porendeckelchen (Exine) herausdrücken, geben nur im Innern, also innerhalb der Intine, Kallosereaktion (Abb. 13).

Die bekannten Pfropfen in den Pollenschläuchen, die Lloyd (1899) als Zellulosepfropfen (*Diodia virginiana* [Rubiaceae]) bezeichnet, waren von Mangin (1890 und 1892) als Kallose identifiziert worden (*Narcissus* sp.).

Jost (1907) benutzt die elektive Färbbarkeit der Kallose mit Anilinblau, um den Pollenschlauch auf seinem Weg durch die Narbe und den Griffel zu verfolgen. Er gibt an, daß auch die innere Wandung des Pollenschlauches aus Kallose besteht (*Secale cereale*, *Lilium bulbiferum*, *Lilium*

<sup>6</sup> Diese „Zellstoffhaufen“ bezeichnet Zander (1935) als „Keimhof“, neuerdings wurde von Hyde (1955) dafür der Ausdruck „Oncus“ eingeführt.

*tigrinum*, *Corydalis cava*, *Corydalis lutea*). Cooper (1928) benutzte Lackmold zur Anfärbung des „Pollenschlauches“ im Griffel. Bradbury (1929) spricht von regelrechten „Kallosewänden“ des Pollenschlauches (*Prunus* sp.). Sie konnte mit Hilfe der Resorzinblaufärbung den Pollenschlauch bis zum Embryosack verfolgen. Ich habe Pollenschläuche von *Galanthus nivalis* auf Saccharoseagar (10% Saccharose in 2% Agar gelöst) kultiviert und mit Karminessigsäure und Resorzinblau angefärbt. Die Schläuche zeigten 1–4 dicke Kallosepfropfen. In der Regel befanden sich die Kerne mit der Hauptmenge des Plasmas im vordersten Teil des Schlauches, also vor den Kallose-

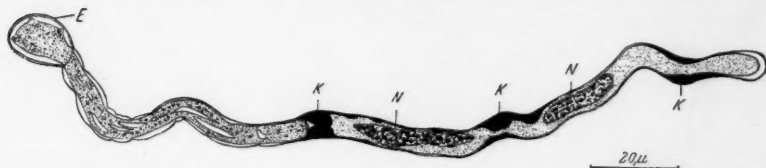


Abb. 14. Pollenschlauch von *Galanthus nivalis*. Auf 10%igem Saccharoseagar kultiviert. Karminessigsäure-Resorzinblaufärbung. Kallose (K) schwarz. E = Exine, N = Kerne.

pfropfen. Kallose in der Schlauchspitze war nur selten zu sehen. In einigen Fällen war dicht hinter der Schlauchspitze ein Kallosering ausgebildet, der das Plasma an dieser Stelle zusammenschnürte. In diesen Schläuchen zeigte sich an der Spitze selbst keine Kallose. Das Bild erweckt den Eindruck, als ob an der Spitze des Pollenschlauches in gewissen Abständen Kallose gebildet wird, die als Ringwulst das lebende Plasma samt Kernen vorbeiläßt und schließlich den gesamten Querschnitt des Schlauches ausfüllt, somit also den lebenden vom toten Schlauchinhalt (Abb. 14) trennt. Über die Pollenschlauchkultur vgl. Trankowsky (1931), Maheshwari und Wulff (1937).

#### 8. Kallose in Wurzelhaaren

Ridgway (1913) beschreibt als erster das Vorkommen von Kallose in Wurzelhaaren, wobei er allerdings Kalloseanhäufungen mehr pathologischer Art in älteren, funktionslosen Wurzelhaaren erwähnt (Abb. 15). Er zitiert Küster (1903), der „Zellulose“-Verdickungen in Wurzelhaaren beschreibt, die durch Ernährungsstörungen und wachstumshemmende Faktoren außer Funktion gesetzt wurden. Ridgway vermutet, daß es sich dabei um Kallosemassen handelt, die oft ganze Haare verstopfen oder ausfüllen, wie er sie bei *Panicum* sp., *Zea Mays*, *Avena sativa*, *Capriola dactylon*, *Pisum sativum*, *Eupatorium capillifolium*, *Oxalis stricta*, *Vigna catjang* und *Ipomea quinquefolia* gesehen hat. Den Kallosenachweis erbrachte er durch Färbung mit Anilinblau und Corallin-Soda sowie durch einige Versuche über Löslichkeit bzw. Unlöslichkeit in Cuoxam, Säuren und Alkalien. Als Kontrolle benutzte er die Siebröhrenkallose von *Wistaria sinensis*. Ridgway konnte derartige Kalloseanhäufungen sowohl bei jungen wie älteren, bei eingetopften und wildwachsenden Pflanzen beobachten und betonte abschließend, daß die Haare weder krank noch verletzt waren, weder  $\text{CaCO}_3$  enthielten noch in Auflösung begriffen waren.

Das generelle Auftreten von Kallose in Wurzelhaaren mancher Pflanzen wird von Roberts (1916) beschrieben. Bei ihren Untersuchungen über

die Saugkraft der Wurzelhaarzellen stellte sie fest, daß einige Pflanzen eine dritte innerste Wandschicht in den Wurzelhaaren besitzen. (Schwarz (1893) hatte bei Wurzelhaaren nur zwei Membranschichten gefunden, eine äußere Pektinschicht und eine innere Zelluloseschicht.) Diese dritte Schicht tritt gewöhnlich in der Haarspitzenregion auf und läßt sich mit Resorzinblau, Anilinblau und Corallin-Soda als Kallose identifizieren. Nachgewiesen ist ihr Vorkommen bei *Valerianella olitoria*, *Sinapis* sp., *Pisum sativum*, *Tradescantia* sp., *Ceratopteris thalictroides*.

Demgegenüber stellte Howe (1921) fest, daß Wurzelhaare im allgemeinen gar keine mittlere Zelluloseschicht besitzen, sondern stets (zirka 20 Arten wurden untersucht) eine äußere Pektin- und eine innere Kallozelamelle besitzen. Letztere schwankt in der Dicke, ist aber immer in der Haarspitze am dicksten. Der Nachweis erfolgte mit Resorzinblau.



Abb. 15. Wurzelhaar mittleren Alters. Kallose schwarz. Plasmareste punktiert. Vakuole weiß. Mit drei schematischen Querschnitten (nach Ridgway 1913). (400X.)



Abb. 16. Junges Schleimhaar von *Osmunda regalis*. Ältere Zellen mit Stärkekörnchen, Kallose (K) an den Querwänden, ohne Maßstab (nach Gardiner und Ito 1887).

### 9. Kallose in Trichomen

Gardiner und Ito (1887) fanden Kallosebeläge auf den siebartig durchbrochenen Querwänden der Schleimhaare von *Osmunda regalis* und *Blechnum occidentale* (Abb. 16). Bei *Osmunda* sollen auch die Perforationen der Querwände mit Kallose ausgekleidet sein. Gefärbt wurde mit Corallin-Soda und Wasserblau. Die Autoren bemerkten, daß die Kerne der kalloseführenden Haarzellen bald zugrunde gehen, lebende Haarzellen findet man nur an der Basis ganz junger Wedel.

Mangin (1892) gibt an, daß die Haare (ein Organ ist nicht genannt) von *Geranium molle* im Innern einen wurmförmigen, um sich selbst gedrehten, zylindrischen „Cordon“ von Kallose besitzen. Ferner fand er in



allen Haarbasen und Epidermisapillen der Blätter von *Myosotis palustris* Kallose. Bei *Vitis vinifera* fand er nach Anfärbung mit Anilinblau eine „blaue Rosette“ von kallofeführenden Epidermiszellen rings um die Basis der Haare. Ältere *Vitis*-Blätter führen Kallose in den Epidermiszellen rings um die Wasserspalten. Besonders regelmäßig findet sich Kallose in den verkalkten Haaren von Boraginaceenblättern.

Die Trichomkallose scheint sehr weit verbreitet zu sein. So konnte ich bei mehreren Campanulaceen und Boraginaceen feststellen, daß Kallose besonders bei steifen (Spieß-) Haaren, vor allem der Kelchblätter, vorkommt, gleichgültig, ob die Haarwände verkalkt, verkieselt oder nicht inkrustiert sind. Gewöhnlich findet sich dabei ein ringförmiger Kallosewulst im Innern der Haarbasis. Vielfach ist auch die ganze Haarzelle innen mit einer dünnen Kallosoescheit ausgekleidet, die sich in der Haarspitze zu einem Kallosepfropf kumuliert; dies fällt besonders auf, wenn die Spitze des Haares abgebrochen ist (Taf. 1, Abb. 4). Der dann frei herausragende Kallosepfropf erweckt den Eindruck, als ob er die Wunde verschließe. (Da jedoch dieser Kalloseverschluß nicht regelmäßig auftritt, war es mir bisher nicht möglich, festzustellen, ob er vor oder nach dem Abbruch gebildet wird.)

#### 10. Kallose in Zystolithen

Wie Mangin (1892) berichtet, beobachtete Chareyre (1884) an Zystolithen von Urticaceen und Moraceen eine „substance gommeuse“, die in Wasser etwas anschwellt und eine schwache Deformation des Zystolithen verursachte. — Mangin identifizierte diese Substanz als Kallose und konnte feststellen, daß sie in den Lithocysten der meisten *Urticales* vorhanden ist. So fand er Zystolithenkallose bei: *Urtica perennis*, *Parietaria officinalis*, *Broussonetia papyrifera*, *Ficus elastica*, *Ficus carica*, *Ficus religiosa*, *Humulus lupulus* und *Morus alba*. Mangin glaubte, daß Kallose ein Calciumcarbonatbegleiter sei (vgl. jedoch Boraginaceen-Perikarpien, C 11).

Die „Schleimcystolithen“ der Urticacee *Girardinia palmata* Gaudick. (Schorn 1907) scheinen keine Kallose zu besitzen, da sie sich in Wasser — wenn auch erst nach 24 Stunden — lösen. Schorn stellte nur fest, daß sie sich mit Rutheniumrot anfärben.

Die von Rabiger (1952) beschriebene zarte Hülle um die Zystolithen konnte ich bei *Ficus*-Arten nicht entdecken (Eschrich 1954).

Zystolithenkallose scheint ausschließlich bei den *Urticales* (vor allem Urticaceen, Moraceen, Cannabinaceen) und bei Boraginaceen vorzukommen. Bei Acanthaceen-Zystolithen (*Strobilanthes crispus*, *Sanchezia nobilis*) konnte ich keine Kallose finden.

Am besten wurde die Gattung *Ficus* untersucht. Renner (1910) bringt eine ausführliche Zusammenstellung über die anatomische Beschaffenheit der Zystolithen zahlreicher *Ficus*-Arten. Als besonders kallosereich bezeichnet er die Zystolithen von *Ficus pseudopalma* Blanco. Ferner konnte ich noch bei *Ficus Rumphii*, *Ficus Hookeri*, *Ficus cyadistipula*, *Ficus saussureana* und *Ficus triangularis* (Taf. 1, Abb. 5) Kallose finden. *Ficus heterophylla* besitzt keine Zystolithenkallose.

Die Zystolithen der Boraginaceen finden sich hauptsächlich in Epidermiszellen an der Basis von Haaren (Avetta 1894, Jakovljević 1925).



Über die Funktion der Zystolithenkallose ist nichts bekannt. Sie könnte jedoch als abschließende Schicht zwischen dem Lithocysteninnern und den radiären Kanälen des Zystolithenkörpers gedeutet werden.

#### 11. Kallose in Perikarprien

Mangin (1892) fand in Fruchtwänden von Boraginaceen Zellen, die Kallose enthielten. Da er Kallose nicht nur in kalkhaltigen Zellen des Exokarps, sondern auch in kalkfreien Endokarpzellen beobachtete, äußerte er die Meinung, daß Kallose nicht nur Kalkbegleiter sei, sondern auch aus „destruierten“ Parenchymzellwänden entstehe. Diese Kallosevorkommen waren bisher noch nicht bestätigt worden; deshalb habe ich darüber einige Untersuchungen angestellt, die gesondert veröffentlicht werden sollen. Einige bisherige Befunde seien jedoch hier kurz wiedergegeben:

1. Das Vorkommen von Kallose ist bei Boraginaceen-Perikarprien nicht an das Vorhandensein von  $\text{CaCO}_3$  in den Zellwänden gebunden. Kallose tritt auch in Perikarprien auf, die kein  $\text{CaCO}_3$  enthalten.

2. Findet sich Kallose in Exokarpzellen, so tritt sie besonders stark in den Zellen der meist reichlich kutinisierten Epidermis auf (*Cynoglossodeae*).

3. Mesokarpkallose tritt wahrscheinlich nur bei Vertretern der *Heliotropioideae* auf.

4. Bei *Symphytum* findet sich Kallose nur im Endokarp.

5. Außer bei Boraginaceen wurde Kallose auch im Perikarp von Schließfrüchten anderer Familien gefunden: *Hydrophyllaceae* (*Phacelia*), *Umbelliferae* (*Myrrhis*, *Conium*) (Taf. 1, Abb. 1).

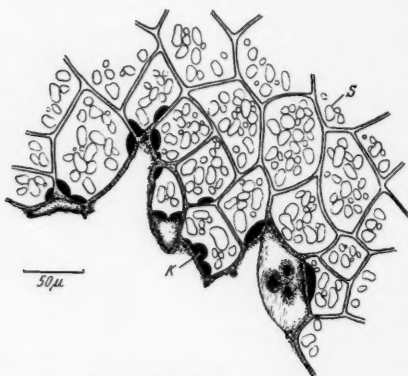


Abb. 17. Kallosepolster in der „Exodermis“ des Rhizoms von *Ophioglossum vulgatum*, Querschnitt, Kallose (K) (schwarz). S = Stärke.

#### 12. Kallose in Abschlußgeweben

Außer den Epidermen (Boraginaceenfrüchte, *Allium-cepa*-Zwiebel, Zystolithen) scheinen auch andere Abschlußgewebe Kallose zu bilden. Die Bemerkung Mangins (1892), daß alte Blätter, die Wundkork besitzen, Kallose in den Zellwänden enthalten, veranlaßte mich, die Blattstiele abgefallener Blätter zu untersuchen. Ich konnte jedoch nur bei *Aesculus hippocastanum* in den Trenngeweben benachbarten Blattstielzellen dünne Kallozelamellen finden. Auf der entsprechenden Stammseite traten mitunter Kal-

losepolster auf. Bei *Pirus communis* und *Castanea vesca* ließ sich niemals Kallose dieser Art feststellen.

In einem weiteren Fall beobachtete ich im Rhizom von *Ophioglossum vulgatum* in der äußersten Rindenschicht, die man als Exodermis bezeichnen könnte, Wandbeläge von Kallose an der Außenwand oder auch Kallosepolster. Diese Kallose fand ich jedoch immer nur an Wänden, die nicht verkorkt waren (Abb. 17).

### 13. Kallose in Lentizellen

An der Basis der Blattstiele von *Ficus elastica* konnte ich bei jungen Lentizellen z. T. erhebliche Kallosemengen beobachten (Abb. 18 und Taf. 1, Abb. 2). Die Epidermis- und Hypodermiszellen rings um den Lentizellenschlund (die Schließzellen des ehemaligen Spaltöffnungsapparates waren schon verkorkt und deformiert) enthalten, sofern ihre Zellwände noch nicht verkorkt sind, große Kallosepolster. Mit Einsetzen der Korkgewegebildung verfärben sich die Wände der kalloseführenden Zellen braun, die vorhandene Kallose bleibt teilweise erhalten und ist später oft noch als Rest in den äußersten Zellagen des Lentizellenrandes zu erkennen. Auch bei Lentizellen, die nicht unter Spaltöffnungen entstanden, fand ich Kalloseeinlagerungen. Offensichtlich wird die Kallosebildung eingestellt, sobald ein Korkgewebe gebildet ist, das die Öffnung verschließt. Kallose scheint also hier als vorläufiges Verschlussmittel zu fungieren.



Abb. 18. Junge Lentizelle an der Blattstielbasis von *Ficus elastica*. Kallose (K) schwarz. Radialer Längsschnitt.

### 14. Kallose in der Wurzel-„Endodermis“

Nach Angaben von Poirault (1891 a, b und 1893) besitzen die radialen Längswände der Endodermis von alten Wurzeln der Ophioglossaceen linsenförmige, bikonvexe Kallosebeläge (Nachweis mit Anilinblau). Diese aus der Abb. 19 hervorgehende Anordnung hat eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Querschnittsbild einer Endodermis mit Casparischen Streifen. Im Längsschnitt erkennt man jedoch — wie Poirault schreibt —, daß es keine bandförmigen Verdickungen sind, sondern kreisrunde Flecke, die oft zu mehreren in einer Zelle vorhanden sein können. Es ist fraglich, ob es sich hier um eine Endodermis handelt. Ähnliche Verdickungen, die von Esau (1943) als kollenchymatisch bezeichnet wurden, finden sich bei *Pirus communis*-Wurzeln in der Rindenzellenschicht, die der Endodermis benachbart ist.

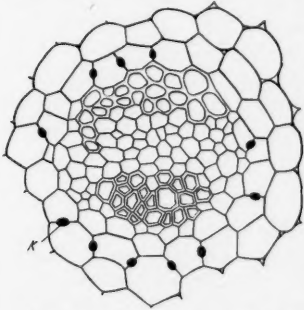


Abb. 19. Monarches Wurzelbündel von *Ophioglossum vulgatum*. Kallose (K) schwarz. Querschnitt, ohne Maßstab (nach Poirault 1891).

### 15. Kallose in Wundgeweben

Das Auftreten von Kallose an Wundrändern ist keineswegs als regelmäßig zu bezeichnen. Mangin (1892) schreibt, daß an leichten Wunden im *Vitis*-Blatt sehr selten Kallose zu finden ist. Kallose hat — wie eingangs erwähnt — mit dem Wund„kallus“ nichts zu tun.

Gelegentlich findet man in Präparaten von verletzten Pflanzenstengeln (etwa bei Pfropfungen) vereinzelt Zellen an der Peripherie der Wunde, die, nach Behandlung mit Resorzinblau, einen oder mehrere blaue Klumpen enthalten, von denen anzunehmen ist, daß es sich um Kallose handelt. Allerdings gibt es Fälle,

wo Kallose regelmäßig an Wundrändern vorzukommen scheint. So berichtet Currier (persönliche Mitteilung) über das Fluoreszieren von Wundrändern bei *Ficus* nach Behandlung mit alkalischer Anilinblaulösung. (Eine zwar etwas stärker gelbe Fluoreszenz geben auch suberinisierte Wände, deswegen wäre es nötig, das Vorhandensein von Kallose dort auch mit Resorzinblau nachzuweisen.)

Wie bereits in Abschnitt C 1 ausgeführt, stellte Fischer (1886, p. 10) fest, daß ein großer Teil der Siebröhrenkallose erst bei der Verletzung intakter Siebröhren entsteht. Seine durch Abbrühen ganzer Pflanzen gewonnenen Siebröhrenpräparate zeigten nur geringe Kallospuren an den Siebplatten. Demnach würde die für gewöhnlich an Siebplatten beobachtete Kallose bereits ein infolge Wundreiz entstandenes Produkt darstellen. Die Siebröhren müßten also in sehr kurzer Zeit Kallose bilden können. Weiter konnte Fischer beobachten, daß abgeschnittene Zweigstücke beim Liegen innerhalb 24 Stunden beträchtliche Mengen von Siebröhrenkallose zu bilden vermögen.

#### 16. Kallose in Tüpfelkanälen

Das Auftreten der Kallose an Stellen des Pflanzenkörpers, wo Kommunikationen zu Nachbarzellen (Siebröhren) oder dem Außenmedium (*Caulerpa*, Wunden) mikroskopisch nachweisbar sind, läßt vermuten, daß auch die Tüpfel der Zellwände lebender Zellen Kallose, vielleicht nur in Spuren, enthalten.

Tatsächlich haben Currier und Strugger (1956) etwas Derartiges beobachten können. Der bereits unter B 1 beschriebene fluoreszenzoptische Kallosenachweis mit alkalischer Anilinblaulösung glückte den Autoren bei den Epidermistüpfeln der *Allium-cepa*-Zwiebelschuppe. Bei vorsichtiger Präparation lassen sich in fast allen Epidermistüpfeln winzige Kalloseknötchen auf diese Art nachweisen. Da ab und zu auch größere, gelbgrün fluoreszierende Knötchen zu finden sind, versuchte ich, diese Zellen mit Resorzinblau nachzubehandeln und konnte in zwei Fällen regelrechte Kallosepolster zu beiden Seiten der Tüpfel anfärben. Bei der Plasmolyse verbleiben die Polster an der Wand wie bei jungen Siebröhren. Diese Kallosepolster größeren Umfanges traten in beiden Fällen in der engsten Umgebung von Zellen auf, die Krampfplasmolyse zeigten und unscharf begrenzte Kerne enthielten. Auf der Seite der normal reagierenden Zellen waren die Kallosetüpfel wesentlich größer als auf der Seite der wahrscheinlich beschädigten Zellen.

Ob es sich hierbei um eine Abwehr- oder Abschlußmaßnahme gegen kranke, absterbende oder sich in irgendeiner Weise abnorm verhaltende Zellen handelt, ist nicht zu entscheiden. Auf alle Fälle finden sich geringe Kallosemengen auch in Tüpfeln gesunder Gewebe.

Die gleiche fluoreszierende Tüpfelkallose beobachtete ich auch in parenchymatischen Mesokarpzellen verschiedener Boraginaceen (*Cynoglossum*, *Paracaryum*, *Lindelofia*). Auch bei *Phacelia tanacetifolia* (*Hydrophyllaceae*) konnte ich an besonders dünnen Stellen der Fruchtwand Tüpfelkallose mit Resorzinblau anfärben.

Über die experimentelle Auslösung der Bildung von Tüpfelkallose vgl. Abschnitt D 1.

## D. Über die Bildung und den Abbau der Kallöse

### 1. Kallösebildung unter dem Einfluß chemischer Substanzen und Viren

Die sehr aktuelle Methode, blattrollvirusinfizierte Kartoffelknollen durch den Nachweis starker Kallösebildung in den Siebröhren zu kennzeichnen, rechtfertigt vielleicht eine ausführliche Besprechung dieses Abschnittes.

In vier etwa zur gleichen Zeit erschienenen Arbeiten wird die Entdeckung gemacht, daß Kartoffelknollen und -pflanzen, die mit Blattrollvirus infiziert sind, außergewöhnlich viel Kallöse in den Siebröhren enthalten und dadurch von gesunden Knollen, deren Siebröhren nur normale Kallösepolder zeigen, unterschieden werden können. Der Nachweis der Kallöse erfolgte in allen Fällen auch mit Resorzinblau (Hofferbert und Zu Putlitz 1955, Sprau 1955, Moericke 1955, Baerecke 1955).

Im gleichen Jahr (1955) wurde eine Patentanmeldung über ein „Verfahren zur Frühdiagnose von Viruskrankheiten bei Pflanzen“, Erfinder: Igel und Lange, bekanntgegeben, die allerdings bereits 1953 angemeldet war. Es handelt sich um die gleiche Entdeckung.

Daß Virusstoffe Veränderungen des Phloemgewebes verursachen können, ist bereits mehrfach beschrieben worden. Quanj er (1913) beobachtete, daß das Blattrollvirus die Siebröhren der Kartoffel zum Absterben bringt, wobei degenerative Veränderungen der Siebzellen entstehen. Er bezeichnete diese Erscheinung als „Phloemnekrose“. Die Zellwände färben sich allmählich gelb, sie schwellen unregelmäßig an, teilweise tritt Obliteration ein, und schließlich verholzen die Membranen sogar. Quanj er (1919) und Neger (1919) stellten fest, daß die Ableitung der Assimilate aus Blättern kranker Pflanzen wesentlich langsamer vor sich geht als bei gesunden Pflanzen. Schweizer (1926) konnte durch Hinzuführen von Eiweißlösungen die äußeren Krankheitssymptome und auch die Nekrosen rückgängig machen; er war der Meinung, daß die Nekrosen durch Eiweißmangel hervorgerufen würden. Eine zusammenfassende Darstellung über virusbedingte Obliterationen, Nekrobiosen und Nekrosen geben Brehmer und Rochlin (1931). Mit den Ursachen, die bei Befall mit Blattrollvirus zur Krankheit führen, befaßt sich die monographische Darstellung von Es-march (1932), worin auch die gesamte ältere Literatur berücksichtigt ist.

Die erste Arbeit, bei der auch die Siebröhrenkallöse in Betracht gezogen wird, stammt von Esau (1935). Bei der Kräuselkrankheit (curly top virus) der Zuckerrüben scheint die Pflanze nach Infektion die Fähigkeit zu verlieren, Kallöse auszubilden. Es treten sofort Phloemnekrosen auf. Am gleichen Objekt beobachteten Artschwager und Starett (1936) Schwellungen und warzenartige Beläge im Phloem kräuselkranker Sämlingswurzeln. Sie bezeichneten diese Substanz als „Pseudokallus“, der nur von resistenten Pflanzen als Schutz gegen die Infektionsstoffe gebildet werden soll.

Später versuchte man das Virus selbst im Phloem nachzuweisen. Macworth er (1941) färbte mit Trypanblau Viruskristalloide an. Bald (1949) benutzte ebenfalls diesen Farbstoff, konnte aber auch mit der Giemsa-färbung (Azur-Eosin-Methylenblau) nekrotisches Gewebe nachweisen, wobei sich einzelne Phloemelemente purpurrot anfärbten. Bode (1947) beschrieb zum erstenmal ein Testverfahren, wonach blattrollvirusinfizierte Kartoffelknollen mit Fuchsin dort eine Rotfärbung zeigten, wo das nekro-

tische Gewebe verholzt war. Hutton (1949) prüfte auf Grund der gleichen Erscheinung mit Phloroglucin und Salzsäure umfangreiches Material. Nach einem weiteren Verfahren von Heilmann (1955) sollen infizierte Siebröhren rote Fluoreszenz aufweisen, wenn die Schnitte nach einer Behandlung mit 0,01% Bordeauxrot und 0,05% Acridinorange 15 Minuten dem UV-Licht ausgesetzt werden.

Es ist anzunehmen, daß es sich bei der vermehrten Kallosebildung infolge Virusinfektion um eine ähnliche Erscheinung handelt, wie sie Schumacher (1950) mit seiner Eosinreaktion erhielt (vgl. C 1). Wahrscheinlich stellt die Kalloseproduktion eine Abwehrreaktion dar, die bei schwach giftigen Substanzen abläuft. Stärkere Gifte verursachen, wenn nicht sofort ein Absterben der Gewebe an der Injektionsstelle eintritt, Phloemnekrose.

An dieser Stelle sei auf eine Beobachtung hingewiesen, die ich an Epidermistüpfeln von *Allium cepa* und *Rhoeo discolor* machte. Ausgehend von der Schumacherschen Eosinreaktion versuchte ich, durch Hinzufügen von Eosin eine vermehrte Kalloseproduktion auch in den Tüpfeln auszulösen: um einmal nachzuprüfen, ob Currier und Strugger (1956) tatsächlich Kallose bei *Allium* gesehen hatten, zweitens um festzustellen, ob auch hier die Kallose die gleiche Reaktion gibt wie in Siebröhren. Die Versuchsanordnung ist denkbar einfach: eine *Allium-cepa*-Zwiebel wird in einer feuchten Kammer von den vertrockneten Schuppen befreit, die Epidermis der freigelegten turgeszenten Schuppe an mehreren Stellen mit einem kleinen Tropfen Eosin-Agar (2%ige Agarlösung in der Hitze mit Eosin stand. 1 : 500 versetzen) versehen, wobei die Epidermis durch einen Nadelstich verletzt wird. In zwei von fünf untersuchten Präparaten konnte ich oberhalb (in Richtung zur Blattspitze) der Wunde in einem Abstand von 10–15 Zellen relativ dicke Kallosepolster mit Resorzinblau nachweisen. Die Polster befanden sich nur an wenigen Tüpfeln der Zellen. Gleichzeitig ließ sich feststellen, daß in der gleichen Geweberegion die Zellkerne durch die Tüpfel gewandert waren (vgl. auch Mische 1901), so daß sich in einzelnen Zellen zwei oder gar drei Zellkerne fanden, andere Zellen jedoch kernlos waren. In einem Falle sah ich einen Kern mitten in einem Tüpfelkanal stecken, so daß er zu beiden Seiten bauchig in die Zellräume ragte. Bei Kontrollpräparaten, die mit reinem Agar ohne Eosin behandelt worden waren, konnte ich in keinem Falle weder Kallosevermehrung noch Kernverlagerung beobachten. Die gleiche Kallosebildung stellte ich bei *Rhoeo discolor*-Blattepidermen fest. Bei *Vanilla planifolia* (abgeschnittene Blätter) trat bei gleicher Behandlung keine Kallose auf. Diese Versuche werden fortgesetzt.

An den von Boas (1916) beobachteten Verdickungen in Pilzzellen, die durch Säureeinwirkung entstehen, ist keine Kallosereaktion versucht worden (vgl. auch Balbach 1938 und Kusano 1936).

## 2. Mikrobieller Abbau der Kallose

Die Befunde, wonach Kallose, wenn sie direkt mit dem Außenmedium in Berührung kommt, langsam verschwindet, deuten darauf hin, daß sie von Mikroorganismen abgebaut wird. In diese Richtung weisen die Angaben Zalewskis (1883) und Mangins (1891), die Reste von Konidienträgern, die aus Kallose bestehen, sich auflösen sahen (vgl. C 6). Schmidt (1917) ließ dagegen Siebröhren mit Kallosepolstern längere Zeit in Wasser liegen, ohne einen Abbau zu bemerken, obwohl er Massen von Bakterien

in der Flüssigkeit fand. Bei Zystolithenkallose konnte ich einen mikrobiellen Abbau durch stäbchenförmige Bakterien feststellen (Eschrich 1954). Diese Erscheinung wurde von mir nochmals bei Siebröhrenkallose von *Victoria cruziana* nachgeprüft. Bei den Verdauungsversuchen (vgl. B5) mit Papain machte ich die Feststellung, daß Kallose nur in Papainlösungen, die mit KCN aktiviert waren, erhalten blieb, wurde das Papain mit Cystein aktiviert, so verschwand die Kallose nach 1–2 Tagen vollständig. Die Siebplatten waren dann von Bakterienmassen bedeckt. Gleichgeformte Bakterien fand ich in den Siebröhrenfragmenten von *Cucurbita*-Wurzeln, die ich 2 Wochen unter Komposterde aufbewahrt hatte. Auch hier war die Kallose fast restlos zerstört, die Zellulosewände dagegen waren noch nicht angegriffen.

### E. Zusammenfassende Diskussion

Bei der Fülle der beschriebenen Einzelbeobachtungen von Kallosevorkommen dürfte es von besonderer Wichtigkeit sein, Zusammengehöriges hervorzuheben und Unvereinbares zu sondern. Allerdings kann es sich bei solchen Erwägungen immer nur um Theorien, wenn nicht gar um Spekulationen handeln, deren Richtigkeit festzustellen späteren Forschungen vorbehalten bleiben muß.

Das einzig Gemeinsame aller Kallosen ist die Färbbarkeit mit Resorzinblau. Wir sind also gezwungen, alles das als Kallose zu bezeichnen, was sich mit Resorzinblau anfärben läßt. Alle anderen Farbstoffe sind für Definitionsfragen unbrauchbar. Natürlich ist damit noch nicht gesagt, daß alle resorzinblaupositiven Stoffe substantiell das Gleiche sein müssen. Es ist jedoch anzunehmen, daß die Resorzinblaufärbung eine Adsorptionsfärbung darstellt (Schmidt 1917), daß also zumindest die Textur des Stoffes oder seine Struktur sich in allen Fällen ähneln.

Maßgebend für alle Daten chemischer und physikalischer Art sind die Eigenschaften der Siebröhrenkallose, welche die Priorität auf den Namen Kallose besitzt. Demnach ist die Definition der „echten“ Kallose um einige Daten, über die Einigkeit unter den Siebröhrenforschern besteht, zu erweitern:

Kallose ist eine gelartige, hyaline Substanz, die in Wasser und verdünnten starken Säuren unlöslich ist. Konzentrierte Mineralsäuren hydrolysieren Kallose in der Hitze. Sieht man von Küsters (1951) (vgl. S. 493 und S. 496) Befunden ab, so läßt sich noch hinzufügen, daß Kallose auch in Cuoxam nicht gelöst wird und daß sie optisch isotrop ist. — Jedes weitere Faktum stößt in der Literatur auf Widerspruch oder ist hypothetischen Ursprungs. Da für die Kallosevorkommen außerhalb der Siebröhren chemische und physikalische Daten nur spärlich vorliegen, muß die allen Kallosen gemeinsame Resorzinblaufärbung und Unlöslichkeit in Cuoxam als Grundlage für eine vergleichende Betrachtung der Kallosen genügen.

Viele Theorien, die bisher über die Funktion der Kallose aufgestellt wurden, mögen für den betreffenden Einzelfall recht einleuchtend sein. Beziehungen zu anderen Kallosevorkommen lassen sich jedoch nur teilweise oder gar nicht knüpfen.

So ist die von Wilhelm (1880) vertretene Auffassung, Kallose sei ein Reservestoff, genau so unbefriedigend wie der Vorschlag Russows (1882),



Kallose als Sekret zu betrachten. Gleichfalls abzulehnen ist die von Mangin (1890) vertretene Meinung, Kallose sei eine Grundsubstanz für den Aufbau der Zellmembran. Die mehrfach geäußerte Auffassung, Kallose sei die Vorstufe der Zellulose, könnte für Wurzelhaar-, Pilzhyphen- oder Pollenschlauchspitzen zutreffen, versagt jedoch schon z. B. bei den Kallosepfropfen der Pollenschläuche. Die häufig geäußerte Feststellung, daß Kallose besonders in Geweben und Zellen auftritt, die einer alsbaldigen Auflösung entgegensehen, trifft für zahlreiche Vorkommen (Trichome, Zystolithen, *Caulerpa*, Tüpfelkanäle, Abschlußgewebe) nicht zu, außerdem erklärt sie nichts von der eigentlichen Funktion der Kallose.

Zwei weitere Gesichtspunkte, die für eine Funktionsbestimmung der Kallose von Bedeutung sein könnten, fallen — obwohl bei den Siebröhren Klarheit darüber herrscht — für eine Diskussion aus, da die Verhältnisse bei den anderen Kallosevorkommen unbekannt sind. Es sind dies einmal die hohe Permeabilität des Siebröhrenprotoplasten (Wanner 1952) und zweitens die Kernlosigkeit der Siebröhrenglieder. Es wäre z. B. denkbar, daß sich die regulierende Wirkung der Kallose und damit ihr Auftreten vor allem auf Zellen erstreckt, deren Protoplasten dem Eintreten fremder, vielleicht giftiger Stoffe infolge einer Permeabilitätserrhöhung ausgesetzt sind. Inwieweit eine Kerndegeneration, wie sie bei Siebröhren auftritt, an der Herstellung dieses Zustandes beteiligt ist, läßt sich selbst bei Siebröhren noch nicht abgrenzen. Diesem „prämortalen Zustand des Siebröhrenprotoplasten“ (Huber und Rouschal 1958) kann jedoch für die Kallosebildung wenig Bedeutung zugemessen werden, da bereits Kallose in jungen kernhaltigen Siebröhren vorkommt und auch sonst vielfach in besonders jungen Zellen auftritt (Pollenschläuche, Wurzelhaare, Pilzhyphen).

Weniger abwegig erscheinen die Äußerungen über die Bedeutung der Kallose als dauerndes oder periodisch regulierendes Verschuß- oder Schutzmittel. Weitaus der größte Teil der Kallosen findet sich an Orten, wo ein Austausch von Stoffen zwischen benachbarten Zellen oder zwischen Pflanze und Außenwelt stattfindet oder stattfinden könnte. Dies trifft zu für Siebröhren, die charakteristischen Leitbahnen der Assimilationsprodukte, für Tüpfelkanäle von *Allium-cepa*-Epidermen, für Milchröhren, die auf kurze Strecken Stoffe zu transportieren vermögen. Der von der Zellwand her gebildete Zystolithenkörper wird durch einen Kallosemantel von dem Zellraum der Lithocyste getrennt. Die Kallose der „Endodermis“ von *Ophioglossum* könnte als Regulativ bei der Stoffaufnahme in den Zentralzylinder bezeichnet werden. Bei verkalkten oder verkieselten Trichomen trennt die Kallose den Zellinhalt von der Außenwelt ab, was bei den besonders exponierten Trichomen als Infektionsschutz deutbar wäre. Das gleiche gilt für Abschlußgewebe, die nicht wie die Epidermis eine schützende Kutikula oder verdickte Außenwand besitzen, oder die Periderme, die durch mehrschichtige lückenlose Anordnung ein Eindringen von Fremdkörpern und -stoffen verhindern. In derartigen ungeschützten Abschlußgeweben findet sich Kallose, z. B. bei der „Exodermis“ von *Ophioglossum*, bei Lentizellen, die noch keinen schützenden Kork gebildet haben. Die an Wundrändern ab und zu beobachteten Kallosevorkommen lassen sich auch in dieser Richtung deuten. In etwas anderer Weise läßt sich die Kalloosefunktion in den Spitzen von Wurzelhaaren, Pollenschläuchen und Pilzhyphen erklären. Es handelt sich hierbei um schnell-



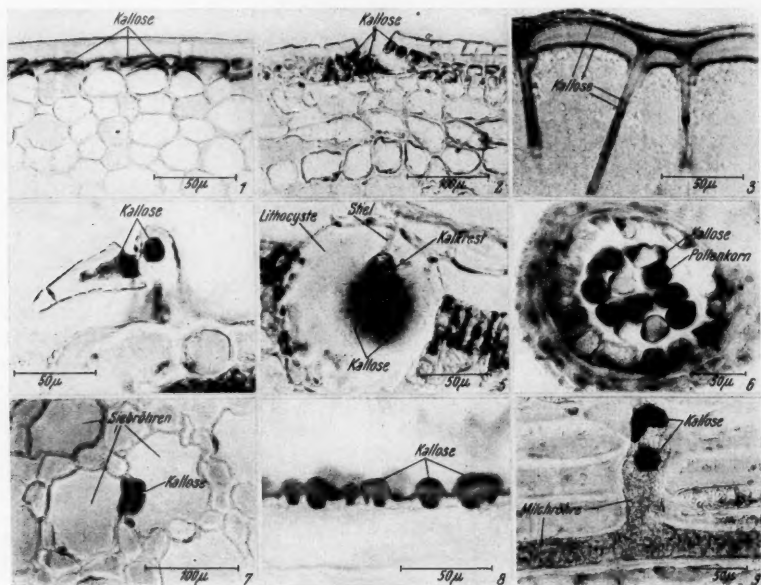
wüchsige und äußerst dünnwandige Zellen, die zum Teil gar keine Zellulosemembran ausbilden. Die Kallose übernimmt hier also die Funktion einer Membran, bei der es weniger auf Festigkeit als auf Schutz vor eindringenden Stoffen anzukommen scheint. Die in diesen drei Organen auftretenden Kallosepolster und -pfropfen können als Ventile oder Verschlüsse gedeutet werden, bei Pollenschläuchen gegen das Zurückströmen von Plasma und Kernen, bei Wurzelhaaren gegen eingedrungene Keime oder unerwünschte Stoffe und bei Pilzhypphen als Abriegelung gegen abgestorbene Hyphenabschnitte. Die Kallose in den Keimhöfen der Pollenkörner könnte einerseits einen Stoffein- oder -austritt durch die fehlende oder unterbrochene Exine der Keimporen regulieren, andererseits aber nur Baumaterial für den keimenden Schlauch darstellen. Die Kallosemembran von *Caulerpa prolifera* dürfte den Stoffaustausch zwischen Schlauchzelle und Meerwasser regulieren. Die bisher als Zellstoffbalken bezeichneten Kallose-röhren stellen Einstülpungen des Schlauchmantels dar und können als Transportbahnen für aus dem Wasser aufgenommene Nährstoffe angesehen werden. Die Kallose in den Perikarpzellen mancher Schließfrüchte könnte einerseits den weichhäutigen Samen vor Infektionen schützen, andererseits eine regulative Funktion bei der Keimung übernehmen. Die PMZ-Membran schützt die unreifen Pollenkörner so lange, bis eine Exine ausgebildet ist, dann ist ihre Aufgabe erfüllt, sie gibt, indem sie sich auflöst, die Pollenkörner frei. Das gleiche gilt für die Konidienträger, die so lange mit den Konidien verbunden bleiben, bis sich die Konidienmembran geschlossen hat, dann „degeneriert“ die Trägerkallose zu einer wasserlöslichen Substanz und gibt die fertigen Konidien frei, indem sie sich selbst auflöst.

Wenn diese Schutz- und Regulationstheorie auch teilweise recht spekulativ erscheint, so ist sie doch allen anderen Theorien von der Kallofefunktion dadurch überlegen, daß sie alle Erscheinungsformen auszulegen vermag.

Überall ist die Kallose eng mit der Zellwand verknüpft, wenn sie nicht sogar die Zellwand selbst darstellt (PMZ, *Caulerpa*). In den meisten Fällen tritt sie aber an denjenigen Wandteilen auf, die mit Durchtrittsstellen für das Plasma versehen sind (Siebporen, Tüpfel), oder sie verengt das Zelllumen zu derartigen Durchtrittsstellen (Pollenschläuche, Pilzhypphen).

Die elektronenoptischen Untersuchungen an Pollenschlauchkallose (Mühlethaler und Linskens 1956) zeigen, daß Kallose kein mizellares Gefüge besitzt, sondern eine völlig homogene Substanz darstellt. Wenn man die chemischen Analysen (Mangin 1910, Eschrich 1954) verallgemeinern darf, so stellt Kallose ein wasserunlösliches Polysaccharid dar, dessen Grundbaustein d-Glukose ist. Die einzelnen Moleküle müssen in einer Art verknüpft sein, die bisher bei Glukose unbekannt ist, denn Stärke und Zellulose sind im Gegensatz zu Kallose optisch anisotrop. Schleime zerfließen in Wasser, Kallose nicht. Verschiedene Befunde deuten darauf hin, daß Kallose außerordentlich schnell gebildet werden kann (Fischer 1886, Schumacher 1930). Sie kann auch relativ schnell wieder abgebaut werden, zumindest wesentlich schneller als Zellulose. Dieser Auf- und Abbau der Kallose erfolgt in lebenden Zellen. (Der Kalloseabbau in obliterierten Siebröhren ist unkontrollierbar. Die dort gefundenen kallosefreien Siebplatten haben möglicherweise nie Kallose besessen oder ihre Kallose wurde bereits zu Lebzeiten des Siebröhrengliedes abgebaut.) Besonders eigentümlich ist, daß das Auftreten von Kallose nie mit Sicherheit vorausgesagt werden kann. Pilzhypphen, Pollenschläuche und -körner,

Zystolithen, Wurzelhaare, Trichome, Tüpfel und anderes können Kallose enthalten, aber auch bar jeder Spur von Kallose sein. Selbst Siebplatten brauchen nicht immer von Kallose bedeckt zu sein. — Es ist offensichtlich,



Tafel 1.

- Abb. 1. Exokarp von *Myrrhis odorata*. Kalloseabscheidungen in der Epidermis.  
 Abb. 2. Junge Lentizelle an der Blattstielbasis von *Ficus elastica*. Die der Lentizellenöffnung benachbarten Zellen enthalten Kallose.  
 Abb. 3. Querschnitt durch die Thallusachse von *Caulerpa prolifera*. Kallose in Lamellen abgelagert.  
 Abb. 4. Abgebrochene Spitze eines Kelchhaares von *Campanula rapunculus*. Das Zellinnere der Haarspitze ist von Kallose ausgefüllt.  
 Abb. 5. Entkalkter Zystolith von *Ficus triangularis* (Blatt).  
 Abb. 6. Pollentetraden mit Kallosehülle im Pollensack von *Campanula rapunculus*. Pollenkörner nur zum Teil vorhanden.  
 Abb. 7. Querschnitt durch Siebröhren von *Victoria cruziana* (Blattstiel). Dickses Kallosepolster an einer Siebröhrenlängswand.  
 Abb. 8. Längsschnitt durch Siebröhren von *Cucurbita pepo* (Wurzel). Einseitige Kalloseauflagerung an der Siebröhrenlängswand.  
 Abb. 9. Kalloseverschluss in einer Milchröhrenabzweigung bei *Ficus elastica*.

daß die Kallose keinen im eigentlichen Sinne regelmäßigen anatomischen Bestandteil der beschriebenen Pflanzenorgane darstellt, sondern je nach der physiologischen Notwendigkeit gebildet oder weggelassen wird. (Eine Ausnahme mag vielleicht *Caulerpa* bilden, doch

ist die „physiologische Notwendigkeit“ des Vorhandenseins einer Kallosehülle für die Schlauchzelle stets vorhanden, denn ohne sie wäre die Ernährung der ganzen Pflanze nicht denkbar.) Besonders klar zeigen dies die Eosinreaktionen (Schumacher 1930) und die blattrollvirusinfizierten Kartoffeln. Hier wird durch das Eindringen von Fremdstoffen in den Zellverband, also durch einen chemischen Reiz, die Kallosebildung ausgelöst oder verstärkt. Inwieweit für andere Kallosevorkommen etwas Ähnliches gilt, muß die Erfahrung lehren.

Der hier gemachte Versuch, die Funktion der Kallose zu erklären, konnte infolge des knappen heterogenen Tatsachenmaterials nur unbefriedigend ausfallen. Es ist anzunehmen, daß die Entdeckung weiterer Kallosevorkommen auch eine Erklärung der Kallosekfunktion fördern wird.

#### Literatur

- Archer, W., 1880: On the minute structure and mode of growth of *Ballia callitricha* Ag. (Sensu latiori). Trans. Linn. Soc., 2. Serie (Bot.) 1, 211—232.
- Arens, K., 1949: Prova de calose por meio da microscopia a luz fluorescente e aplicações do metodo. Lilloa (Tucuman) 18, 71—75.
- Arnold, A., 1956: Ein neues Reagens auf Kallose. Naturw. 43, 233—234.
- Artschwager, E., and R. C. Starrett, 1936: Histological and cytological changes in sugar-beet seedlings affected with curlytop. J. Agric. Res. 53, 637—657.
- Avetta, C., 1894: Über die Cystolithen der Blätter von einigen *Coccinia*-Arten. Ann. R. Ist. Bot. Roma 5, 181.
- Baerecke, M.-L., 1955: Der Nachweis der Blattrollinfektion bei Kartoffeln durch ein neues Färbeverfahren. Züchter 25, 309—313.
- Balbach, H., 1938: Beiträge zur Kenntnis der Nekrose des pflanzlichen Protoplasmas. Protoplasma 29, 228—245.
- Bald, J. G., 1949: Additional methods for fixing and staining viruses in infected plant tissues. Amer. J. Bot. 36, 333—342.
- Bary, A. de, 1877: Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne, in: W. Hofmeister, Handb. d. physiolog. Bot. 3, Leipzig (W. Engelmann).
- Benedikt, R., und P. Julius, 1884: Über ein neues Resorzinblau. Mh. Chem. 5, 534—535.
- Boas, F., 1916: Jodbläuende stärke- und zelluloseähnliche Kohlehydrate bei Schimmelpilzen als Folge der Wirkung freier Säuren. Ber. dtsh. bot. Ges. 34, 786—796.
- Bode, O., 1947: Beitrag zum frühzeitigen Nachweis der Blattrollkrankheit der Kartoffel durch Anfärbung des Phloems. Festschr. O. Appel (B. Z. A., Berlin-Dahlem) 34—36.
- Bradbury, D.: A comparative study of the developing and aborting fruits of *Prunus cerasus*. Amer. J. Bot. 16, 525—542.
- Brehmer, W. V., und E. Rochlin, 1931: Histologische und mikrochemische Untersuchungen über pathologische Gewebsveränderungen viruskranker Kartoffelstauden. Phytopath. Z. 3, 471—498.
- Chareyre, J., 1884: Nouvelles recherches sur les cystolithes. Rev. Sci. nat. Montpellier III. sér. 4, 1 (Diss.).
- Cheadle, V. J., E. M. Gifford jr., and K. Esau, 1953: A staining combination for phloem and contiguous tissues. Stain Technol. 28, 49—53.

- Cooper, J. R., 1928: The behaviour of pollen tubes in self and cross pollination. Proc. Amer. Soc. f. Horticult. Science 25, 138—140.
- Correns, C., 1894: Über die Membran von *Caulerpa*. Ber. dtsch. bot. Ges. 12, 355—367.
- Crafts, A. S., 1933/34: Phloem anatomy in two species of *Nicotiana*, with notes on the interspecific graft union. Bot. Gazette 95, 592—608.
- 1939: The protoplasmatic properties of sieve tubes. Protoplasma 33, 389—398.
- Carrier, H. B., and S. Strugger, 1956: Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L. Protoplasma 45, 552—559.
- Engard, C. J., 1944: Organogenesis in *Rubus*. Univ. Hawaii Res. Publ. 21, 254.
- Esau, K., 1935: Ontogeny of the phloem in sugar beets affected by the curly-top disease. Amer. J. Bot. 22, 149—165.
- 1943: Vascular differentiation in the pear root. Hilgardia 15, 299—324.
- 1947: A study of some sieve-tube inclusions. Amer. J. Bot. 34, 224—235.
- 1948: Phloem structure in the grapevine and its seasonal changes. Hilgardia 18, 217—275.
- Eschrich, W., 1953: Beiträge zur Kenntnis der Wundsiebröhrenentwicklung bei *Impatiens Holsti*. Planta 43, 37—74.
- 1954: Ein Beitrag zur Kenntnis der Kallose. Planta 44, 532—542.
- Esdorn, I., und R. Schanze, 1954: Untersuchungen über den Schleim von *Calluna vulgaris* (L.) Hull. Pharmazie 9, 995—1005.
- Esmarch, F., 1932: Die Blattrollkrankheit der Kartoffel. Berlin, J. Springer.
- Farr, C. H., 1916: Cytokinesis of pollen-mothercells of certain dicotyledons. Mem. N.Y. Bot. Gard. 6, 253—317.
- Farr, W. K., 1954: Structure and composition of the walls of the conidiophores of *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius*. Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II 16, 209—214.
- Fischer, A., 1884: Untersuchungen über das Siebröhrensystem der Cucurbitaceen. Berlin, Gebr. Borntraeger.
- 1886: Neue Beiträge zur Kenntnis der Siebröhren. Ber. math.-phys. Kl. kgl. sächs. Ges. d. Wiss. 38, 291—336.
- Frey, R., 1950: Chitin und Zellulose in Pilzzellwänden. Ber. Schweiz. bot. Ges. 60, 199—230.
- Frey-Wyssling, A., 1950: Electron microscopy of cell walls. Proc. of the 7. internat. Bot. Congr. (Stockholm) 362.
- Gardiner, W., 1885: Observations on the constitution of callus. Proc. Camb. Phil. Soc. 5, 250.
- and T. Ito, 1887: On the structure of mucilage-secreting cells of *Blechnum occidentale* and *Osmunda regalis*. Ann. Bot. 1, 27—54.
- Gilson, E., 1895: Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des champignons. La Cellule 11, 7—15.
- Greis, H., 1937: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Basidiomyceten. II. Fruchtkörperbildung und Basidienentwicklung von *Tulostoma mammosum* Fries. Jb. wiss. Bot. 84, 517—552.
- Haberlandt, G., 1904: Physiologische Pflanzenanatomie. 3. Aufl. Leipzig (Engelmann).
- Hanstein, J., 1864: Die Milchsaftegefäße und die verwandten Organe der Rinde. Berlin, Wiegandt u. Hempel.
- Harder, R., 1951: Schizo-, Thallo-, Bryo- und Pteridophyten, in: Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 25. Aufl., Stuttgart, Piscator.
- Hartig, Th., 1851: Lehrbuch für Förster. 9. Aufl.

- Heilmann, U., 1955: Über den Nachweis von Blattrollvirus an Kartoffelknollen mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes. Nachr.bl. dtsh. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) 7, 44.
- Hill, A. W., 1901: The histology of the sieve-tubes of *Pinus*. Ann. Bot. 15, 575—611.
- 1908: The histology of the sieves-tubes of Angiosperms. Ann. Bot. 22, 245—290.
- Hofferbert, W., und G. Zu Putlitz, 1955: Neue Erkenntnisse und Erfahrungen über die Blattrollkrankheit der Kartoffel. Beilage z. Nachr.bl. dtsh. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) 7, 1—4.
- Hoffmeister, W., 1888: Die Rohfaser und einige Formen der Cellulose. Landw. Jb. 17, 239—265.
- Howe, C. G., 1921: Pectic material in root hairs. Bot. Gaz. 72, 315—320.
- Huber, B., 1939: Das Siebröhrensystem unserer Bäume und seine jahreszeitlichen Veränderungen. Jb. wiss. Bot. 88, 176—242.
- und R. W. Kolbe, 1948: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Siebröhren. Svensk Botanisk Tidskr. 42, 364—371.
- und E. Rouschal, 1938: Anatomische und zellphysiologische Beobachtungen am Siebröhrensystem der Bäume. Ber. dtsh. bot. Ges. 56, 380—391.
- Hutton, E. M., 1949: The significance of the necrotic phloem reaction in the potato to the leafroll-virus. Austr. J. Scient. Res., Ser. B, 2, 249—270.
- Hyde, H. A., 1955: Oncus, an new term in pollen morphology. New Phytologist 54, 255—256.
- Igel, M., und H. Lange: Verfahren zur Frühdiagnose von Viruskrankheiten bei Pflanzen. Patentanmeldung. D.P.-Amt, Klasse 421, Gruppe 1304 I 7145 IX b/42 1. Anmeldung: 18. 4. 1953; Bekanntmachung: 29.9. 1955.
- Jakovljević, S., 1925: Zystolithi u Borraginoidea. Spomenik (Beograd) 55, 4 (Diss.)
- Janczewski, E. de, 1878: Sur la structure des tubes cribreux. C. r. 87, 179—182.
- 1881: Études comparées sur les tubes cribreux. Mém. Soc. nat. Sc. 23, 209—350.
- 1882: Études comparées sur les tubes cribreux. Ann. Sci. nat. Bot. 14, 50—166.
- Jayme, G., 1951: Über einen neuen wasserlöslichen Cellulosekomplex. Das Papier 5, 244—251.
- und K. Neuschäffer, 1955: Über celluloselösende Tri-(en)-Zinkhydroxyd-lösungen. Naturw. 42, 536.
- Jost, L., 1907: Über die Selbststerilität einiger Blüten. Bot. Ztg. 65, 77—117.
- Kaan Albest, A. v., 1934: Anatomische und physiologische Untersuchungen über die Entstehung von Siebröhrenverbindungen. Z. Bot. 27, 1—94.
- Kisser, J., 1926: Leitfaden der botanischen Mikrotechnik. Jena, Fischer.
- Koch, 1884: Über den Verlauf und die Endigungen der Siebröhren in den Blättern. Bot. Ztg. 42, 401—411, 417—427.
- Kusano, Sh., 1936: On the parasitism of *Olpidium*. Jap. J. Bot. 8, 155—187.
- Küster, E., 1903: Pathologische Pflanzenanatomie. Jena.
- 1951: Über die Siebplatten und Siebfelder der *Cucurbita*-Siebröhren und ihren Kallus. Z. Mikrosk. 60, 157—162.
- Leconte, H., 1888: Note sur le développement des parois criblées dans le liber des angiospermes. Bull. Soc. Bot. France 35, 405—407.
- 1889: Contribution à l'étude du liber des angiospermes. Ann. Sci. nat. Bot. 10, 193—324.
- Lloyd, F. E., 1899: The comparative embryology of the *Rubiaceae*. Mem. Torr. Bot. Club 8, 1—112.

- Lodewick, J. E., 1928: Seasonal activity of the cambium in some northeastern trees. New York State Col. Forestry, Syracuse Univ. Bul. 1 (Techn. Publ. 23), 1—87.
- Luynes, V. de, 1864: Sur la préparation du tournesol. C. r. 59, 49—51, zit. in: Jber. Fortschr. Chem. 551.
- Macworther, F. P., 1941: Plant virus differentiation by trypan-blue reactions within infected tissue. Stain Technol. 16, 143—149.
- Maheshwari, P., and H. D. Wulf, 1937: Recent advances in microtechnic. I. Methods of studying the male gametophyte of angiosperms. Stain Technol. 12, 61—70.
- Mangin, L., 1889 a: Observations sur la membrane du grain de pollen mur. Bull. Soc. Bot. France 36, 274—284.
- 1889 b: Observations sur le développement du pollen. Bull. Soc. Bot. France 36, 386—393.
- 1890 a: Sur la callose nouvelle substance fondamentale existant dans la membrane. C. r. 110, 644—647.
- 1890 b: Sur les réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane. C. r. 111, 120—123.
- 1891: Sur la désarticulation des conidies chez les Péronosporées. Bull. Soc. Bot. France 38, 176—184, 232—236.
- 1892 a: Sur la constitution des cystolithes et des membranes incrustées de carbonat de chaux. C. r. 115, 260—261.
- 1892 b: Observations sur la présence de la callose chez les phanérogames. Bull. Soc. Bot. France 39, 260—267.
- 1894: Sur la constitution de la membrane chez quelques champignons, en particulier chez les polyporées. Bull. Soc. Bot. France 41, 375—384.
- 1895: Recherches anatomiques sur les péronosporées. Bull. Soc. Hist. Nat. Autun, 8, 55—108.
- 1910: Nouvelles observations sur la callose. C. r. 151, 279—283.
- Miche, H., 1901: Über die Wanderungen des pflanzlichen Zellkernes. Flora 83, 105—142.
- Mirande, R., 1913 a: Sur la présence de la callose dans la membrane des algues siph. mar. C. r. 156, 475—477.
- 1913 b: Recherches sur la composition chimique de la membrane et le morcellement du thalle chez les Siphonales. Ann. Science nat., 9 Sér. 18, 147—264.
- Moericke, V., 1955: Über den Nachweis der Blattrollkrankheit in Kartoffelknollen durch den Resorzintest. Phytopath. Z. 24, 462—464.
- Mohl, H. v., 1855: Einige Andeutungen über den Bau des Bastes. Bot. Ztg. 13, 873—881, 889—897.
- Molisch, H., 1923: Mikrochemie der Pflanze. 3. Aufl., Jena, Fischer.
- Moore, S. L., 1891: An investigation into the true nature of callus: The vegetable-marrow and *Ballia callitricha* Ag. J. Linn. Soc. 27, 501—526.
- Mori, T., 1935: Seaweed polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. 8, 315—350.
- Mühdorf, A., 1941: Über die Vorgänge der Bildung und Auflösung der Wände bei den Pollentetraden angiospermer Pflanzen. Beih. Bot. Centr. 60, 557—640.
- Mühlethaler, K., 1950: The structure of plant slimes. Exper. Cell Res. 1, 341—350, 1950.
- and H. F. Linskens, 1956: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pollenschläuchen. Experientia (Basel) 12, 253—255.
- Nabel, K., 1939: Über die Membran niederer Pilze, besonders von *Rhizidiomyces bivellatus* nov. spec. Arch. Mikrobiol. 10, 515—541.



- Naegeli, C., 1844: *Caulerpa prolifera*. Z. wiss. Bot. 1, 134.
- 1861, 1863: Über die Siebröhren von *Cucurbita*. S.ber. bayr. Akad. Wiss. München 212—238 u. Bot. Mitt. 1, 1—27.
- Nebel, B. R., 1931: Lacmoid-martius-yellow for staining pollen tubes in the style. Stain Technol. 6, 27—29.
- Neger, F. W., 1919: Die Blattrollkrankheit der Kartoffel. Z. Pflanzenkrankh. 29, 27—48.
- Noll, F., 1888: Über die Funktion der Zellstoff-Fasern in *Caulerpa prolifera*. Arb. Bot. Inst. Würzburg 3, 459—465.
- Oliver, F. W., 1887: On the obliteration of the sieve tubes in *Laminariaeae*. Ann. Bot. 1, 95—117.
- Oltmanns, F., 1904: Morphologie und Biologie der Algen. Bd. I. Jena, Fischer.
- Poirault, G., 1891a: Sur quelques points de l'anatomie des organes végétatifs des Ophioglossées. C. r. 112, 967—968.
- 1891b: Sur les tubes criblées des Filicinées et des Equisétinées. C. r. 113, 232—234.
- 1895: Recherches anatomiques sur les cryptogames vasculaires. Ann. Sci. nat. Bot., 7. Sér. 18, 113—256.
- Pringsheim, H., und D. Krüger, 1932: Schleime, in: G. Klein, Handb. d. Pflanzenanalyse 3<sup>1</sup>, 65—69, Wien, Springer.
- Quanjér, H. M., 1913: Die Nekrose des Phloems der Kartoffelpflanze, die Ursache der Blattrollkrankheit. Meded. Landbouwh. Wageningen 6, 41.
- und Mitarb.: 1919: De Mozaïckziekte van de Solanaceen, hare verwantschap met de phloemnecrose en hare betekenis voor de aardappelcultuur. Meded. Landbouwh. Wageningen 17, 1—90.
- Rabiger, F. H., 1932: Untersuchungen an einigen Acanthaceen und Urticeen zur Funktion der Cystolithen. Planta 40, 121—144.
- Rendle, A. B., 1889: On the vesicular vessel of onion. Ann. Bot. 3, 169—177.
- Renner, O., 1910: Die Lithocysten der Gattung *Ficus*. Beih. Bot. Cbl. 25, 183—200.
- Resch, A., 1954: Beiträge zur Cytologie des Phloems. Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen bei *Vicia faba* L. Planta 44, 73—98.
- Ridgway, C. S., 1913: The occurrence of callose in root hairs. Plant World 16, 116—122.
- Roberts, E. A., 1916: The epidermal cells of roots. Bot. Gazette 62, 488—506.
- Russow, 1881: Verhalten der Callusplatten gegen Anilinblau und die Vertheilung derselben bei den Gefäßpflanzen. Neue dörpische Ztg.
- 1882: La structure et le développement des tubes cribreux. Ann. Sci. nat. Bot. 14, 167—215.
- Sachs, J., 1870: Lehrbuch der Botanik. Leipzig, Engelmann.
- Schmidt, E. W., 1917: Bau und Funktion der Siebröhre der Angiospermen. Jena, Fischer.
- Schorn, F., 1907: Über Schleimzellen bei Urticeen und über Schleimcystolithen von *Girardinia palmata* Gaudick. S.ber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. 1, 116, 393—410.
- Schultz, G., 1931: Farbstofftafeln. 7. Aufl., Leipzig, Akad. Verlagsges.
- Schumacher, W., 1930: Untersuchungen über die Lokalisation der Stoffwanderung in den Leitbündeln höherer Pflanzen. Jb. wiss. Bot. 73, 770—825.
- Schwarz, F., 1885: Die Wurzelhaare der Pflanzen. Unters. Bot. Inst. Tübingen 1, 135—188.
- Schweizer, G., 1926: Zur Blattrollkrankheit der Kartoffelpflanze. Ber. dtsch. bot. Ges. 44, 551—561.



- Spencer, H. J., 1939: On the nature of the blocking of the laticiferous system at the leaf-base of *Hevea brasiliensis*. Ann. Bot. N. S. 3, 231—235.
- Sprau, F., 1955: Pathologische Gewebeeränderungen durch das Blattrollvirus bei der Kartoffel und ihr färbetechnischer Nachweis. Ber. dtsch. bot. Ges. 68, 239—246.
- Steward, F. C., and K. Mühlethaler, 1953: The structure and development of the cell-wall in the *Valoniaceae* as revealed by the electronmicroscope. Ann. Bot. N. S. 17, 295—316.
- Strasburger, E., 1891: Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Histolog. Beitr. 3, Jena, Fischer.
- und M. Koernicke, 1923: Botanisches Praktikum, 7. Aufl., Jena, Fischer.
- Sykes, M. G., 1908: Anatomy and histology of *Macrocystis pyrifera* and *Laminaria saccharina*. Ann. Bot. 22, 291—325.
- Szyszyłowicz, I., 1882: Corallin als mikrochemisches Reagens in der Pflanzenhistologie. Bot. Cbl. 12, 138—139.
- Tanret, C., 1897: Recherches sur les champignons. Bull. Soc. chimique, 3. Sér. 17, 921—927.
- 1910: Sur les relations de la callose avec la fongose. C. r. 151, 447—449.
- Thomas, R. C., 1950: Composition of fungus hyphae. II. *Sclerotinia*. Amer. J. Bot. 17, 779—788.
- Trankowsky, D. A., 1931: Zytologische Beobachtungen über die Entwicklung der Pollenschläuche einiger Angiospermen. Planta 12, 1—18.
- Traub, M. C., und C. Hock, 1884: Über ein Lackmold. Ber. chem. Ges. 172, 2615—2617.
- Tswett, M., 1911: Sur un nouveau réactif colorant de la callose. C. r. 153, 503—505.
- Volz, G., 1952: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. Mikroskopie 7, 251—266.
- Walliczek, H., 1895: Studien über die Membranschleime vegetativer Organe. Jb. wiss. Bot. 25, 209—275.
- Walter, H., 1920: Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. VIII. Das Verhalten der Hefezellen gegen Proteasen. Pflügers Arch. ges. Physiol. 181, 271—284.
- Wanner, H., 1952: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta 41, 190—194.
- Wartha, V., 1876: Über den Lackmusfarbstoff. Ber. chem. Ges. 9<sup>a</sup>, 217—218.
- Wilhelm, K., 1880: Beiträge zur Kenntnis des Siebröhrenapparates dicotyler Pflanzen. Leipzig, Engelmann.
- Will, 1884: Zur Anatomie von *Macrocystis luxurians*. Bot. Ztg. 42, 801—808, 825—830.
- Wille, 1885: Siebhyphen bei den Algen. Ber. dtsch. bot. Ges. 3, 29—31.
- Winterstein, E., 1893: Zur Kenntnis der Pilzzellulose. Ber. dtsch. bot. Ges. 11, 441—445.
- Wisselingh, C. van, 1898: Mikrochemische Untersuchung über die Zellwände der Fungi. Jb. wiss. Bot. 31, 619—685.
- Wurster, C., 1887: Über Farbstoffbildung durch Wasserstoffsuperoxyd. Ber. chem. Ges. 20<sup>e</sup>, 2934—2940.
- Zalewski, A., 1883: Über Sporenabschnürung und Sporenabfallen bei den Pilzen. Flora 66, 228—234, 249—258, 259—271.
- Zander, E., 1935: Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig. I. Pollengestaltung und Herkunftsbestimmung bei Blütenhonig. Berlin.

# Über hundert Jahre Vitalfärbung pflanzlicher Zellen

Von

**Horst Drawert**

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 17. September 1956)

Bereits im 18. Jahrhundert ließ man gefärbte Lösungen wie Tinte und auch den Saft der Früchte von *Phytolacca decandra* in Pflanzen aufsteigen, um den Vorgang der Aufnahme und der Wanderung eines Stoffes zu verfolgen. So beschreibt La Baïsse (1733), daß der rote Farbsaft der Beeren von *Phytolacca decandra* von den lebenden Wurzeln von *Polyanthes tuberosa* und *Antirrhinum majus* aufgenommen wird und in den Pflanzen bis in die Blumenblätter aufsteigt, wo er die Blattadern rot färbt. Bei diesen Versuchen handelt es sich aber noch nicht um Vitalfärbungen im eigentlichen Sinne; denn von Vitalfärbung sprechen wir erst, wenn die Zelle den Farbstoff in ihr Inneres aufgenommen hat und sich Plasma, Kern oder andere Plasmainschlüsse bzw. die Vakuole gefärbt haben, ohne daß zunächst die Zelle größere Schädigungen erkennen läßt.

In der botanischen Literatur wird immer als älteste Schrift auf dem Gebiet der Vitalfärbung die vor siebzig Jahren erschienene grundlegende Arbeit von Pfeffer (1886): „Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen“ zitiert. Allerdings findet man bei Genevois (1938) einen Hinweis, daß bereits „en 1881, Henneguy et Certes ont coloré vitalement des cellules végétales“. Es existiert aber eine noch viel ältere Mitteilung über eine Vitalfärbung pflanzlicher Zellen, die vollkommen in Vergessenheit geraten ist und die es verdient, wieder der Vergessenheit entrissen zu werden. Es handelt sich um die Arbeit von Unger: „Über Aufnahme von Farbstoffen bei Pflanzen“, vorgelegt in der Sitzung der math.-naturw. Klasse der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften zu Wien am 25. Mai 1848. Die Arbeit umfaßt acht Seiten Text und eine sehr aufschlußreiche Farbtabelle.

Der älteste Anilinfarbstoff, das Mauveïn, ist erst im Jahre 1854 entdeckt worden, so daß Unger noch nicht wie Pfeffer mit synthetischen Farbstoffen arbeiten konnte, sondern auf natürliche Farbstoffe angewiesen war. Er benutzte wie La Baïsse vor allem den Farbstoff der Früchte von *Phytolacca decandra* L. Dabei beruft er sich auf ältere Versuche eines anderen Autors: „In der königlichen Akademie der Wissenschaften in Paris wurde vor mehreren Jahren eines Versuches Erwähnung gethan, der nicht

ohne Bedeutung für die Pflanzenphysiologie schien. Er betraf die Färbung weißblütiger Hyacinthen durch den rothen Saft der Kermesbeere (*Phytolacca decandra* Lin.), der denselben zur Aufsaugung dargebothen wurde.“

In den ersten Versuchen begoß Unger einige in Töpfen gezogene weißblühende Hyazinthen nach vorhergehender Trockenhaltung mit dem Farbsaft, den er aus getrockneten Früchten unter Zusatz von Wasser gewonnen hatte. Die Versuche verliefen negativ. Wurde aber im Herbst ausgepreßter und in verschlossenen Gefäßen aufbewahrter Saft angewandt, der schon z. T. in Gärung übergegangen war und auf Lackmuspapier sehr deutlich sauer reagierte, so zeigten die Blüten bereits nach 20 Stunden die erste Spur einer roten Färbung, die sich in den folgenden Tagen verstärkte. In dieser zweiten Versuchsserie stellte Unger die Töpfe in Schalen, die mit dem zwei Drittel mit Wasser verdünnten Preßsaft gefüllt waren.

Unger begnügte sich nun aber nicht wie seine Vorgänger mit der rein makroskopischen Wahrnehmung. Er untersuchte vielmehr die gefärbten Pflanzen auch mikroskopisch, und es ergab sich, daß von den Wurzeln angefangen bis zu den Blumenblättern die Parenchymzellen längs der Schraubengefäße gefärbt waren. Aus den Abbildungen der Farbtafel zu schließen, lag eine reine, diffuse Vakuolenfärbung vor. Die Anzahl der gefärbten Zellen war in den Wurzeln am kleinsten, steigerte sich in den oberirdischen Organen von unten nach oben und erreichte in den Spitzen der Blumenblätter ihr Maximum.

Da im mikroskopischen Bild nur die Parenchymzellen der Leitbündel eine Färbung aufwiesen, die Gefäße aber völlig farblos erschienen, schloß Unger, daß der Farbstoff nicht in den Gefäßen wandert, sondern durch End- und Exosmose von Zelle zu Zelle weiterbefördert wird.

Ähnliche Ergebnisse erzielte Unger mit Abkochungen von Krappwurzeln. Nicht aufgenommen wurden dagegen die Abkochungen von Cochenille sowie die Preßsäfte aus roten Rüben und Beeren von *Ligustrum vulgare*. Andererseits verliefen die mit *Phytolacca*-Preßsaft durchgeführten Versuche an *Narcissus tazetta* und *Calla aethiopica* ergebnislos.

Die angeführten Speicherorte sowie die Abbildungen stimmen vollkommen überein mit den von Küster (1911), Ruhland (1912), Collander (1921), Collander und Holmström (1937) und Drawert (1941) mit Sulfosäurefarbstoffen erhaltenen Befunden. Allem Anschein nach besitzen die Früchte von *Phytolacca* einen natürlichen „sauren“ Farbstoff. Dafür sprechen auch die Angaben von Unger, daß nur sauer reagierender Preßsaft von der Hyazinthe aufgenommen wurde. Nach neueren Untersuchungen liegt wohl ein Pigment vom Typ des Betanins vor (Reznik 1956).

In eigenen Untersuchungen konnte in vitro das identische Verhalten des *Phytolacca*-Farbstoffes mit den Sulfosäurefarbstoffen bestätigt werden. Im Elektrophoreseversuch wandert der Farbstoff eindeutig zur Anode und in Ausschüttelversuchen mit hydrophoben organischen Lösungsmitteln bleibt er in der wässrigen Phase. Dagegen schlugen alle — allerdings bisher nur rein informatorisch durchgeführten — Vitalfärbungsversuche fehl. Gegenüber Blütenblättern, die direkt mit der Farblösung in Berührung kamen,

erwies sich der Preßsaft recht giftig, so daß die Zellen bald abstarben. Nach Baillon (1875) nahmen weißblühende Hyazinthen, die mit den Wurzeln in *Phytolacca*-Farbstofflösungen eintauchten, wohl das Wasser, aber nicht den Farbstoff auf. Die Blüten färbten sich aber nach kurzer Zeit — nur makroskopisch untersucht —, wenn abgeschnittene Blüten-schäfte oder die mit Wundflächen versehene Zwiebelbasis selbst in die Farblösung tauchten. Die Wurzelrinde verhindert nach Baillon die Aufnahme des Farbstoffs.

Diese negativen Ergebnisse brauchen aber keineswegs gegen die Befunde von Unger zu sprechen, da Unger ja erst mit Preßsaft, der in Gärung übergegangen war und sauer reagierte, Vitalfärbungen erhielt. In eigenen Versuchen konnten allerdings auch mit künstlich angesäuerten Farblösungen keine vitalen Färbungen an Blumenblättern erzielt werden. Vielleicht ist durch den Gärungsprozeß in dem von Unger benutzten Preßsaft erst eine aufnehmbare Komponente des Farbstoffs entstanden.

Wie dem auch sei, so muß doch wohl Unger zugestanden werden, daß er nach unseren bisherigen Kenntnissen als erster eine Vitalfärbung erkannt hat. Die Arbeit enthält auch bereits drei Punkte, die sich später als wichtig für die Aufnahme lipophober saurer Farbstoffe herausstellten: 1. die Bedeutung des Transpirationsstromes, 2. die Bedeutung der sauren Reaktion und 3. die besondere Fähigkeit des Leitbündelparenchyms, saure Farbstoffe zu speichern.

#### Literatur

- Baillon, H., 1875: Expérience sur l'absorption par les racines du suc du *Phytolacca decandra*. C. r. l'acad. sc. Paris 80, 426.
- Collander, R., 1921: Über die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. Jb. wiss. Bot. 60, 354.
- und A. Holmström, 1937: Die Aufnahme von Sulfosäurefarbstoffen seitens pflanzlicher Zellen — ein Beispiel der adenoiden Tätigkeit der Protoplasten. Acta Soc. Fauna et Flora Fenn. 60, 129.
- Drawert, H., 1941: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 155, 21.
- Genevois, L., 1928: Coloration vitale et respiration. Protoplasma 4, 67.
- Küster, E., 1911: Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. Jb. wiss. Bot. 50, 261.
- La Baïsse, 1735: Recueil des dissertations qui ont remporté le prix à l'académie des belleslettres, sciences et arts de Bordeaux. 6. (Zitiert nach L. Genevois, 1928.)
- Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. bot. Inst. Tübingen 2, 179.
- Reznik, H., 1936: Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der chymochromen Farbstoffe. S.ber. Heidelberg, Akad. Wiss., math.-naturw. Kl.
- Ruhland, W., 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. 51, 376.
- Unger, F., 1848: Über Aufnahme von Farbestoffen bei Pflanzen. Denkschr. d. math.-naturw. Classe Akad. Wiss. Wien 1, 13.
- 1853: Nachträgliches zu den Versuchen über Aufsaugung von Farbestoffen durch lebende Pflanzen. S.ber. Akad. Wiss. Wien 10, 117.

Kurze Mitteilung

**Ablösung von Zellwandbestandteilen bei schnell wachsenden *Nitella*-Internodialzellen**

Von

**Robert Jarosch**

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichischen Stickstoffwerke AG., Linz

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. April 1956)

Wie bereits Braun (1852) beobachtete, erfolgt das Wachstum der Characeeninternodialzellen parallel zur schraubig verlaufenden Plasma-

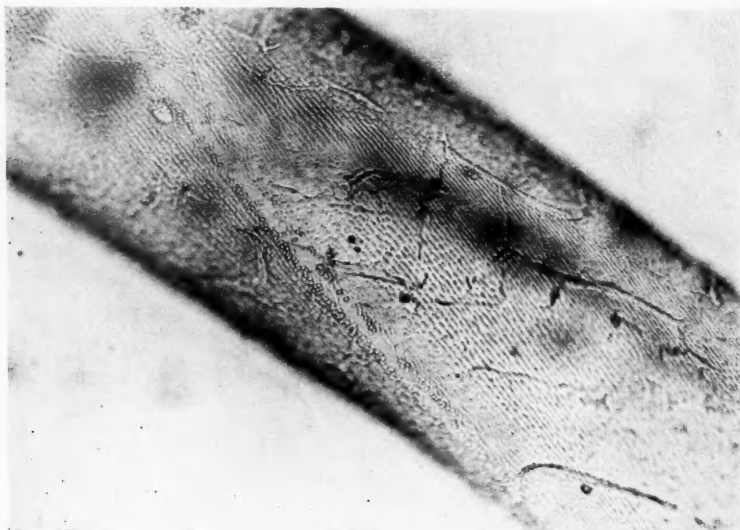


Abb. 1. Teilansicht einer jungen *Nitella*-Internodialzelle mit abgelösten Zellwandbestandteilen. Die Richtung der Plasmaströmung ist an den Chlorophyllkörnerreihen bzw. am Indifferenzstreifen erkennbar.

Photo: E. Schild.

strömung. Genauere Untersuchungen über den Zuwachs, die Veränderung des Neigungswinkels der Strömung u. a. stammen in neuerer Zeit von Green (1954).

Bei der Verfolgung des Wachstums von *Nitella-flexilis*-Internodialzellen im Rahmen von Wuchsstoffversuchen wurden öfters sehr schnell wachsende Zellen beobachtet, die schon durch ihre besondere Zartheit auffielen. Der Plasmawandbelag war in diesen Zellen ziemlich dick, die Chlorophyllkörner hingegen sehr zart und auffallend langgestreckt. Außen der Zellwand anliegend, befanden sich auf diesen Zellen Fasern, deren Enden häufig aufgebogen waren (s. Abb.). Ihre bevorzugte Lage war spiegelsymmetrisch zur Plasmaströmung, wenn als Symmetrieachse die Zelllängsachse angenommen wird.

Anscheinend können die alten Zellwandbestandteile bei übermäßig schnellem Wachstum nicht umgelagert werden, und es kommt zur Ablösung. Green nimmt eine netzartige Textur der Zellwand mit zwei besonders ausgezeichneten Fibrillenrichtungen an, deren Schnittwinkel sich mit dem Wachstum des Internodiums ändern soll. Die bevorzugte Lage der abgelösten Zellwandbestandteile deutet darauf hin, daß es besonders die spiegelsymmetrisch zur Strömung verlaufenden Zellwandfibrillen sind, die bei der übermäßigen Zerrung nicht mitkommen.

#### Literatur

- Braun, A., 1852: Ber. kgl. Preuß. Akad. Wiss. Berlin 1852, 220.  
Green, Paul B., 1954: Amer. J. Bot. 41, 403.

### Referate

**Bartels, P., und H.-O. Schwantes: Quantitative mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme von Thionin durch lebende Zellen von *Allium cepa*** Zeitschr. f. Naturforsch. 10 b (1955), S. 712—720.

Die Untersuchungen von Bartels aus dem Gießener botanischen Institut dürften von allen, die sich mit der Theorie der Vitalfärbung befassen, mit großem Interesse verfolgt werden. Geht es doch hier darum, die Erscheinungen, die der vitalfärbende Zellphysiologe zumeist nur qualitativ nachweisen kann, quantitativ zu messen.

So läßt sich z. B. der vieldiskutierte Umschlagspunkt Membran-Vakuole jetzt exakt erfassen. Die Verfasser bezeichnen den Punkt, an dem in Membran und Vakuole die gleiche Farbstoffkonzentration herrscht, als Isokonzentrationspunkt (IKP). Er liegt für Thionin und *Allium*-Innenepidermen bei pH 10,8.

Ferner gelang der theoretisch bedeutsame Nachweis, daß bei dem untersuchten Farbstoff die Konzentration innerhalb der Vakuole streng proportional ist der Außenkonzentration an undissoziierter Farbbase, was zweifellos eine neuerliche starke Stütze für die Lipoidtheorie der Permeabilität ist.

Darüber hinaus aber bringt die referierte Arbeit auch weitere neue Ergebnisse, zu denen man mit Hilfe der üblichen qualitativen Methoden wohl überhaupt nicht gekommen wäre. Es ließ sich nämlich wahrscheinlich machen, daß es innerhalb der basischen Farbstoffe zwei Gruppen von etwas unterschiedlicher vitalfärberischer Wirkung geben dürfte: einerseits die Farbstoffe mit freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen (z. B. Thionin), andererseits diejenigen mit vollständig methylierten, also  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Gruppen (z. B. Akridinorange und Methylenblau). Die beiden Gruppen unterscheiden sich bezüglich der im alkalischen Bereich entstehenden Farbbasen-Gleichgewichte. Auf diesen Unterschied führen die Verfasser die von ihnen beobachtete Tatsache zurück, daß zwar das Thionin (wie bereits erwähnt) in seiner Speicherung streng der Dissoziationskurve folgt, nicht aber z. B. das Akridinorange (vgl. Bartels, *Planta* 44, 341). Beim letzteren setzt vielmehr die Speicherung schon um etwa zwei pH-Stufen früher ein, als es dem „chemischen“ Umschlagspunkt nach zu erwarten wäre. Eine eindeutige Aufklärung dieser Unterschiede wäre dringend erwünscht.

Ebenfalls von Interesse für den Physiologen ist die auf Grund der Versuchsergebnisse indirekt zu vermutende geringe Pufferkapazität der Zellsäfte bei den untersuchten *Allium*-Innenepidermen. Es scheint, daß die eindringende Farbbase den pH-Wert des Zellsaftes recht bald nach der alkalischen Seite verschiebt. Diese Zellsäfte dürften also im wahrsten Sinne des Wortes „leer“ sein, also nicht nur frei von spezifischen farbstoffbindenden Substanzen, sondern ganz allgemein arm an chemisch aktiven Stoffen, wie z. B. Säuren und anderen Elektrolyten.

H. Kinzel (Wien).



# PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

**ROBERT CHAMBERS**  
NEW YORK

**NOBURÔ KAMIYA**  
OSAKA

**SIEGFRIED STRUGGER**  
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

**JOSEF SPEK**  
ROSTOCK

**FRIEDL WEBER**  
GRAZ

**KARL HÖFLER**  
WIEN

## XLVII. BAND

MIT 191 TEXTABBILDUNGEN UND 23 ZUM TEIL FARBIGEN ABBILDUNGEN AUF 4 TAFELN



**WIEN**  
**SPRINGER-VERLAG**  
1956

ALPHA 1000 9

(72)

# Inhalt

## Abhandlungen

Seite

<b>Alcer, G.:</b> Die Aufnahme von Harnstoff und Glycerin durch die Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der Acidität der Außenlösung und des Zellsaftes . . . . .	77
<b>Arndt, E. A.:</b> Histologische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese und bipolare Differenzierung von Süßwasser-Teleosteen . . . . .	1
<b>Badenhuizen, N. P., and R. W. Dutton:</b> Growth of <sup>14</sup> C-labelled Starch Granules in Potato Tubers as Revealed by Autoradiographs . . . . .	156
<b>Butterfaß, Th.:</b> Modellversuche zur Beeinflussung der Diffusion eines Fluorochroms als Anzeiger des Wasserwegs in pflanzlichen Kapillaren . . . . .	398
— — Fluoroskopische Untersuchungen an Keulenhaaren von <i>Vicia faba</i> L. und <i>Phaseolus coccineus</i> L. . . . .	415
<b>Drawert, H.:</b> Über hundert Jahre Vitalfärbung pflanzlicher Zellen . . . . .	531
— — und <b>Ingeborg Metzner:</b> Untersuchungen zur vitalen Fluorochromierung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot . . . . .	359
<b>Erdmann, K.:</b> Zusammenhänge zwischen reduzierenden Eigenschaften und Schutzwirkung von SH-Verbindungen gegen Strahlen. (Versuche an Euglobulinlösungen)	384
<b>Freytag, K.:</b> Optik und Feinbau der Schleimzellen in den Knollen verschiedener <i>Orchis</i> -Arten . . . . .	237
<b>Jarosch, R.:</b> Die Impulsrichtungsänderungen bei der Induktion der Protoplasmaströmung . . . . .	478
<b>Jonas, H.:</b> A Study of the Dynamics of K <sup>42</sup> uptake by Sunflower Plants with the Aid of a Scintillation Count-Rate Meter . . . . .	67
<b>Kaho, H.:</b> Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Mono- und Disaccharide sowie der mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Säuren auf das Pflanzenplasma. II. Mitt. . . . .	164
— — Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der Zucker und mehrwertigen Alkohole bei der Wirkung von Alkalien auf das Pflanzenplasma. III. Mitt. . . . .	242
<b>Kaja, H.:</b> Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Leukoplasten in der Epidermis von <i>Chlorophytum comosum</i> (Thunb.) Bak. . . . .	280
<b>Keller, R.:</b> Elektropolare Farbstoffe im elektrischen Organ . . . . .	139
<b>Meß, Eva:</b> Kritische Untersuchungen zur kolorimetrischen Bestimmung der isoelektrischen Punkte einzelner Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe . . . . .	189
<b>Miličič, D.:</b> Virus-Zelleinschlüsse in <i>Alliaria officinalis</i> . . . . .	341
<b>Mudrack, K.:</b> Über Größen und Strukturänderungen der Chloroplasten in Rohrzucker- und Elektrolytlösungen . . . . .	461
<b>Schleep, W.:</b> Beiträge zur Physiologie der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättern . . . . .	429
<b>Schoser, G.:</b> Über die Regeneration bei den Cladophoraceen . . . . .	103
<b>Sinapius, D., und W. Schrell:</b> Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Cytoplasma des Aortenendothels . . . . .	217
<b>Thielke, Charlotte:</b> Gerbstoffidioblasten in der Scheide von <i>Carex</i> . . . . .	145
<b>Turian, G.:</b> Le corps paranucléaire des gamètes géants d' <i>Allomyces javanicus</i> traité à l'acide borique . . . . .	135
<b>Umrath, K.:</b> Elektrische Messungen und Reizversuche an <i>Amoeba proteus</i> . . . . .	347
<b>Wartenberg, A.:</b> Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. I. Die Wanderungsrichtung in der Kataphorese . . . . .	305

<b>Wartenberg, A.:</b> Über Kataphoreseversuche mit Hefezellen. II. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Kataphorese . . . . .	324
<b>Weinmann, W. D.:</b> Untersuchungen über die Protein- und Nucleinsäurefraktionen des Zellkernes . . . . .	259
<b>Wiercinski, F. J.:</b> The Microinjection of Adenosine Triphosphate into the Protoplasm of Skeletal Muscle Fibers . . . . .	298
<b>Woochsmann, H.:</b> Die Fällungsmetachromasie der chromotropen Substanzen der Ciliaten und Flagellaten . . . . .	37

### **Sammelreferat**

<b>Eschrich, W.:</b> Kallose (Ein kritischer Sammelbericht) . . . . .	487
-----------------------------------------------------------------------	-----

### **Kurze Mitteilung**

<b>Jarosch, R.:</b> Ablösung von Zellwandbestandteilen bei schnell wachsenden <i>Nitella</i> -Internodialzellen . . . . .	534
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

<b>Referate</b> . . . . .	236, 536
---------------------------	----------

**Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung.** Unter Mitarbeit von K. Bucher, Basel, A. Grumbach, Zürich, A. Kornmüller, Göttingen, J. Kühnau, Hamburg, H. Schaefer, Heidelberg, H. Schoen, Göttingen. Herausgegeben von Prof. Dr. K. Fr. Bauer, Erlangen. Band I. Mit 217 Abb. in 379 Einzeldarstellungen. VIII, 856 S. Stuttgart: Georg Thieme, 1956. Ganzl. DM 129.—.

Auf vielen Gebieten der Naturwissenschaften, besonders aber auf dem der Medizin, arbeitet heute meist jeder Forscher „von seinem speziellen Gesichtspunkt ausgehend und nimmt in der Regel nur unvollkommen Kenntnis von den Resultaten der Untersuchungen auf jenen Fachgebieten, für die er sich nicht als unmittelbar kompetent erachtet. So gehen die meisten Arbeiten der Spezialisten ziemlich beziehungslos nebeneinander her“. Dieser „Fehlentwicklung unseres wissenschaftlichen Lebens“ soll durch die Herausgabe dieses großangelegten Werkes entgegengetreten werden; der erste, glänzend ausgestattete, inhaltlich auf voller Höhe stehende Band ist soeben erschienen. Es soll in ihm ein Stil geschaffen werden, der bei aller wissenschaftlichen Tiefe eine Verständlichkeit aufweist, die es dem einzelnen Forscher ermöglicht, aus allen Beiträgen für sein eigenes Fach Gewinn zu ziehen. In diesem Sinne ist schon im ersten Band die Auswahl der Themen so getroffen, daß nicht etwa nur ein einziges Problem zur Diskussion gestellt wird, wie dies heute bei den Symposien der Fall ist. Es sind vielmehr recht verschiedenartige, hochaktuelle Fragen der Grundlagenforschung behandelt. So wird jeder Leser einerseits wohl etwas finden, wofür er sich ganz besonders interessiert und was sein eigenes Arbeitsgebiet betrifft, andererseits aber verständliche Darstellung anderer Gebiete, von denen er zunächst vielleicht meint, daß sie ihn weniger berühren; er wird bald zur Einsicht kommen, wie sehr die Kenntnis solcher Nachbargebiete für ihn wichtig und wertvoll ist, und so wird er dankbar dafür sein, daß ihm Einblick in das Nachbarland ermöglicht wird. Das Werk ist in erster Linie für Mediziner bestimmt; es soll aber ausdrücklich betont werden, daß auch der Naturforscher, der sich mit anderen Lebewesen befaßt, darin eine gar nicht erwartete Fülle von Anregungen findet. Eigens hervorgehoben seien in dieser Hinsicht folgende Artikel: Tomcsik: Die Struktur der Bakteriengrenzflächen; Glimstedt und Lagerstedt: Die Mitochondrien; Lehmann: Der Feinbau von Kern und Zytoplasma in seiner Beziehung zu generellen Zellfunktionen; Somogyi: Metaboliten und Antimetaboliten; Holzer: Kinetik und Thermodynamik enzymatischer Reaktionen in lebenden Zellen und Geweben; Stepp: Ergebnisse der Vitaminforschung in den Jahren 1950—1954; Wachsmann: Biophysik der Strahlenwirkung. Jedem Artikel ist ein sorgfältig ausgewähltes Verzeichnis des Schrifttums angefügt; in diesem großen Werke ist dies besonders wichtig, weil die Literaturquellen ja auch dem Nichtspezialisten zugänglich gemacht werden sollen.

F. Weber (Graz).

**Gessner, Fritz: Hydrobotanik.** Die physiologischen Grundlagen der Pflanzenverbreitung im Wasser. Band I: Energiehaushalt. Mit 291 Abb. und 8 Vierfarbentafeln. XII, 517 S. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1955. Ganzl. DM 44.50.

Die Physiologie der Wasserpflanzen wird in allen Lehrbüchern sehr kurz, meist nur anhangsweise, behandelt; selbst in der 3. Auflage der „Pflanzengeographie auf ökologischer Grundlage“ (Schimper-Faber) werden von insgesamt etwa 1600 Seiten den Gewässern nur 99 Seiten eingeräumt, obwohl sie zwei Fünftel der Erdoberfläche bedecken und kaum eines frei ist von pflanzlichem Leben. Eine regionale Gliederung des Lebensraumes Wasser ist allerdings nicht ohne weiteres möglich, dagegen tauchen hier Probleme auf, derer die Geobotanik entbehrt, wie z. B. die Wirkungen

von Salz- und Süßwasser; auch der Umstand, daß wir bei den Wasserpflanzen primäre und sekundäre Wasserbewohner finden (bei den Landpflanzen sind es ja nur sekundäre Landbewohner), wobei sich im gleichmäßigeren Lebensraum Wasser ursprünglichere Formen erhalten haben, wirft eine Fülle physiologischer Probleme auf. Die ungeheure Literatur hat aber bis heute noch keine selbständige zusammenfassende Darstellung gefunden; es muß daher Gessner als hohes Verdienst angerechnet werden, daß er Problematik und Ergebnisse dieses Teilgebietes der allgemeineren Hydrobiologie in einem auf drei Bände angelegten Werk als Hydrobotanik vorzulegen beginnt. Es ist eine Ökologie auf physiologischer Grundlage, nach dem Vorbild der klassischen Werke über die Landpflanzen, und es muß als erfreulich vermerkt werden, daß sich der Autor angesichts der heute einen breiten Raum einnehmenden biochemischen und physikalischen Analyse physiologischer Probleme vorbehaltlos zur ökologischen Fragestellung als einer im weiteren Sinne ursprünglicheren wissenschaftlichen Naturbetrachtung und Naturforschung bekennt.

Im ersten Band, „Energiehaushalt“, werden unter gründlicher Verarbeitung der Literatur und ergänzt durch ausgedehnte Erfahrungen die physikalischen Faktoren behandelt, Licht- und UV-Strahlung, Wärme, hydrostatischer Druck und Wasserbewegung. Eigene Untersuchungen des Verfassers in den Subtropen (insbesondere Venezuela) haben hier ihren Niederschlag gefunden. Werden auch zellphysiologische Fragen in diesem Zusammenhang nicht eingehender behandelt, so findet der Protoplasmatiker vor allem in einer Abschnitten Resistenz, Lichtempfindlichkeit, Druckwirkungen die einschlägige Literatur zusammengestellt und die Probleme von ökologischer Sicht her behandelt; auch viele andere Abschnitte, wie z. B. die morphologischen Veränderungen durch die Umweltfaktoren, dürften zahlreiche Anregungen für eine protoplasmatische Behandlung geben. Darüber hinaus wird der Zellphysiologe eine zusammenfassende gründliche Darstellung des Lebensraumes, dem eine große Zahl der infolge ihrer Eigenart sich besonders zu zellphysiologischen Untersuchungen eignenden Objekte entstammt, nur begrüßen können.

Wenn vielleicht auch die Darstellung einzelner Fragen etwas ungleich fundiert erscheinen mag, so ist dies nur ein Anreiz, das Fehlende durch weitere Untersuchungen zu ergänzen, wodurch ein weiterer Zweck einer solchen „Inventaraufnahme“ erfüllt erscheint. Es sei in diesem Zusammenhang bemerkt, daß das Buch in seiner jetzt vorliegenden Form eigentlich bereits eine zweite Auflage darstellt, da der erste Satz widriger Umstände halber 1949 eingeschmolzen werden mußte, so daß bis zum jetzt vorliegenden Neudruck Gelegenheit zu gründlicher Vervollständigung gegeben war. Druck und Ausstattung sind vorzüglich. Man darf den folgenden Bänden mit Spannung entgegensehen.

O. Härtel (Graz).

**Handbuch der allgemeinen Pathologie.** Herausgegeben von F. Büchner,

E. Letterer, F. Roulet. II. Band: Die Zelle. 1. Teil: Das Cytoplasma. Bearbeitet von H. W. Altmann, A. Frey-Wyssling, A. Goebel, G. C. Hirsch, E. Müller, M. Watzka, K. Zeiger, A. E. Zeller. Redigiert von F. Büchner. Mit 246 Abb. XII, 735 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag, 1955. Ganzl. DM 174.—.

Bücher und Handbuchartikel über das Cytoplasma haben in der Regel Botaniker oder Zoologen zu Verfassern. Es ist sehr zu begrüßen, daß das Interesse an der Protoplasmaforschung nunmehr auch in alle Zweige der Medizin gedrungen ist und daß es in erster Linie Mediziner sind, die selbst die Bearbeitung des Bandes „Das Cytoplasma“ des großen „Handbuches der allgemeinen Pathologie“ übernommen haben. Man meine nicht, daß

dieser Band etwa nur von Medizinern zu Rate zu ziehen ist. Im Gegenteil, auch der Phytocytologe hat in der glänzenden, reich mit Literatur belegten Darstellung die Möglichkeit, zu vergleichen, wie der Humancytologe die Tatsachen und Probleme sieht. Medizin und Biologie sind ja gerade auf dem Gebiete der protoplasmatischen Grundlagenforschung getrennt marschiert, und die eine hat auf einem, die andere auf einem anderen Gebiet größere Fortschritte gemacht. Begreiflicherweise ist die Humancytologie in allen Fragen der Pathologie der Zelle vielfach tiefer eingedrungen, und die Phytocytologie wird hier viel nach- und aufzuholen haben. So darf man wohl berechtigt sagen, dieser Band des „Handbuches der allgemeinen Pathologie“ sei jedem Biologen zu eingehendem Studium empfohlen.

F. Weber (Graz).

**Oehlkers, Friedrich: Das Leben der Gewächse.** Ein Lehrbuch der Botanik. 1. Band: Die Pflanze als Individuum. Mit 253 Textabb. VIII, 463 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1956. Ganzl. DM 59,60.

In der Reihe der seit dem Krieg erschienenen Lehrbücher der Botanik trägt auch das vorliegende seine eigene Note. Es ist in zwei Bänden angelegt, der erste Band ist erschienen. Er ist der Pflanze als Individuum gewidmet, während der zweite die Pflanze in ihrer Umwelt mit allen Beziehungen, die sich daraus ergeben, behandeln wird. Stoff- und Energiewechsel sind in den zweiten Band verlegt.

Bei der Darstellung der Pflanze als Individuum in dem zu referierenden ersten Band ist das Entwicklungsgeschehen in den Mittelpunkt der Betrachtungen gerückt. Der erste Teil umfaßt „Die Gestalt der Gewächse in Entwicklung und Aufbau“ und entspricht einer kurzgefaßten Entwicklungsanatomie mit Cytologie, Histologie und Organographie. Der zweite Teil trägt den Titel „Die Grenzen der Gewächse“, worunter der Entwicklungsverlauf von der Entstehung des neuen Individuums (Fortpflanzung und Vererbung) bis zu seinem durch Alter, Krankheit und Tod bedingten Ende verstanden wird. Die spezielle Darstellung der Fortpflanzungsweisen teilt sich in die der kernlosen und der kernhaltigen Gewächse, wobei die letzteren in vorteilhafter Weise nicht rein systematisch, sondern nach ihren die Art der Fortpflanzung wesentlich bestimmenden ökologischen Verhältnissen gegliedert sind (Tiefwasserpflanzen, Flachwasserpflanzen und amphibische Gewächse, terrestrisch lebende Pflanzen, Landpflanzen). Der Abschnitt über Vererbung gibt in knappen 50 Seiten einen vorzüglichen Überblick über den heutigen Stand der Vererbungslehre. Eine für Lehrbücher der allgemeinen Botanik begrüßenswerte Neuerung ist die Aufnahme einer kurzen übersichtlichen Darstellung der Krankheiten der Pflanze (Erbkrankheiten, Stoffwechselkrankheiten und parasitäre Krankheiten). Der letzte Abschnitt des Buches behandelt die „Ursachen der Entwicklung“ (Entwicklungsphysiologie) und umfaßt die Physiologie der Keimung, den endogenen Jahresrhythmus, das Wachstum, die Differenzierung der Gewebe, Regeneration, Bedingungen der Reproduktion, Geschlechtsbestimmung usw.

Der in der Einleitung als wesentlich für die „Lebendigkeit“ der Pflanze hervorgehobene Gesichtspunkt der ständigen Veränderung und Entwicklung, die schließlich zwangsläufig durch Zerstörung oder Abnutzung zu einem natürlichen Tod des Individuums führt, hat sich als ein glücklich gewählter „roter Faden“ erwiesen, der sich durch das ganze Werk hindurchzieht und dieses zu einem in sich geschlossenen Ganzen macht.

Die Ausstattung des im Springer-Verlag erschienenen Buches in Bilderung und Druck ist wie gewohnt vorzüglich.

R. Biebl (Wien).



**Precht, H., J. Christophersen und H. Hänsel: Temperatur und Leben.**

Mit 182 Abb. XII, 514 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag, 1955. Ganzl. DM 78.—.

Seit Belehradek hat die Wirkung der Temperatur auf die lebende Zelle und den lebenden Organismus keine zusammenfassende Darstellung mehr gefunden. Es muß daher wärmstens begrüßt werden, daß mit vorliegendem Werk eine dem heutigen Stande der Forschung entsprechende Behandlung dieses Problemkreises gegeben wird. Das Buch gliedert sich in drei voneinander unabhängige Teile. Im ersten (Precht: Wechselwarme Tiere und Pflanzen) werden allgemeinere Gesichtspunkte in den Vordergrund gestellt, einleitend die Temperaturwirkungen auf biologisch wichtige Stoffe, auf sich nicht verändernde Systeme und anschließend auf solche, die sich während der Temperatureinwirkung selbst wieder verändern (z. B. wachsen), behandelt; Nachdruck wird auf den Ersatz des  $Q_{10}$ -Wertes durch die Angabe der temperaturunabhängigen Aktivierungsenergie (Arrhenius-Konstante) gelegt. Weitere Abschnitte behandeln die Zusammenhänge von Körpertemperatur wechselwarmer Organismen mit der Außentemperatur, von Temperatur und Verhalten sowie die ökologische Seite der Temperaturwirkungen (Temperatur und Verbreitung). Es ist zweifellos sachlich begründet, wenn die Wirkungen der Temperatur auf Tiere und Pflanzen gemeinsam abgehandelt werden; daß dabei die Zoologie etwas Übergewicht erhalten hat, mag in der Natur der Sache liegen, vielleicht auch etwas am Autor, dessen eigene Forschungsergebnisse in diesem Teil ihren Niederschlag gefunden haben. Die dabei zwangsläufig anfallende Stofffülle konnte nur durch straffe Gliederung und eine auf alles Historische verzichtende und auf das Wesentliche bzw. ausgewählte Beispiele beschränkte Darstellung gemeistert werden, wobei man sich aber gelegentlich doch etwas größere Übersichtlichkeit gewünscht hätte; fast wäre man versucht, zur Einarbeitung die Lektüre einiger Abschnitte des zweiten Teiles (Mikrobiologie, bearbeitet von Christophersen) zu empfehlen. Die Mikrobiologie zeigt auch hier, wie sehr sie infolge der größeren Einheitlichkeit und des einfacheren Baues ihrer Objekte zur Erarbeitung und didaktisch klaren Darstellung fundamentaler Lebensvorgänge geeignet ist. In diesem Abschnitt werden besonders die Probleme der Hitzeabtötung, der Hitze- und Kälteresistenz, der Pasteurisation usw. behandelt, wobei naturgemäß auch praktische Probleme berührt werden. Besondere Behandlung erfahren auch die thermophilen Organismen; man ist allerdings etwas überrascht, die einschlägigen Arbeiten Vouks überhaupt nicht erwähnt zu finden, man wäre auf eine Stellungnahme zu seiner Theorie der „Fervorisierung“ gespannt gewesen! Der dritte Teil, Mensch und warmblütige Tiere (bearbeitet von Hänsel), dürfte vor allem das Interesse der Physiologen und Mediziner wecken, Fragen der Regelung der Körpertemperatur (Bildung und Abfluß der Wärme, Steuerung) und der Temperaturgrenzen stehen im Vordergrund; die Darstellung schließt mit Abschnitten über Winterschlaf und verwandte Erscheinungen und Verbreitung der Homoiothermen. Die reichlich eingearbeitete Literatur (das Autorenregister zählt über 2000 Namen auf), die Dreiteilung des Stoffes und seine Behandlung durch verschiedene Autoren von verschiedenen Gesichtspunkten aus machen das Buch besonders wertvoll und sichern ihm zweifellos einen großen Interessentenkreis. O. Härtel (Graz).

Fortsetzung von der II. Umschlagseite

Butterfaß, Th.: Fluoreskopische Untersuchungen an Keulenhaaren von <i>Vicia faba</i> L. und <i>Phaseolus coccineus</i> L. . . . .	415
Schleep, W.: Beiträge zur Physiologie der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättern . . . . .	429
Mudrack, K.: Über Größen- und Strukturänderungen der Chloroplasten in Rohrzucker- und Elektrolytlösungen . . . . .	461
Jarosch, R.: Die Impulsrichtungsänderungen bei der Induktion der Protoplasmaströmung . . . . .	478
Drawert, H.: Über hundert Jahre Vitalfärbung pflanzlicher Zellen . . . . .	531

Sammelreferat

Eschrich, W.: Kallöse. (Ein kritischer Sammelbericht) . . . . .	487
-----------------------------------------------------------------	-----

Kurze Mitteilung

Jarosch, R.: Ablösung von Zellwandbestandteilen bei schnell wachsenden <i>Nitella</i> -Internodialzellen . . . . .	534
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Referate

Referate . . . . .	536
--------------------	-----

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Politis, J.: Über die Tanninoplasten oder Gerbstoffbildner der Rosaceen . . . . .	6. 9. 1955
Günther, Elisabeth: Der Einfluß chemischer und physikalischer Faktoren auf die protoplasmatischen Eigenschaften isolierter <i>Elodea</i> -Blätter unter besonderer Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Wachstumsphase und Plasmaviskosität . . . . .	7. 3. 1956
Bélehrádek, J.: A Unified Theory of Cellular Rate Processes Based Upon an Analysis of Temperature Action . . . . .	3. 5. 1956
Weiss, Gertrude: Über Schollen- und Kristallaggregatbildung im extraplasmatischen Raum vitalgefärbter Zellen . . . . .	4. 5. 1956
Kamiya, N., H. Nakajima and Sh. Abe: Physiology of the Motive Force of Protoplasmic Streaming . . . . .	16. 5. 1956
Koshimizu, Y., and N. Jizuka: Origins and Formation of Intracellular Inclusions Associated with two Leguminous Virus Diseases . . . . .	16. 5. 1956
Stälfelt, M. G.: The Influence of Distilled Water on the Fluidity of Protoplasm . . . . .	18. 5. 1956
Weber, F.: Trichome an Crown-Galls von <i>Nicotiana</i> . . . . .	22. 5. 1956
Parker, J.: Seasonal Changes in Some Chemical and Physical Properties of Living Cells of <i>Pinus ponderosa</i> and their Relation to Freezing Resistance . . . . .	8. 6. 1956
Erdmann, K., Ingeborg Meyer und S. Junghans: Versuche zur Verhinderung von Ultraviolett-Wirkungen auf den Inhalt überlebender tierischer Zellkerne mit Strahlen-Schutzstoffen . . . . .	18. 6. 1956
Höfler, K.: Mikrosomen und Meiosomen . . . . .	16. 7. 1956
Miličić, D.: Vitalfärbungsversuche mit reduziertem Neutralrot an „vollen“ Zellsäften einiger höherer Pflanzen . . . . .	16. 7. 1956
Reiter, Liselotte: Vitale Fluorochromierung pflanzlicher Virus-Einschlußkörper . . . . .	16. 7. 1956
Pirson, A., und G. Schaefer: Osmotischer Wasserentzug und Plasmolyse mit Polyäthylenoxyd . . . . .	24. 7. 1956
Werckmeister, P.: Über einen eigenartigen Körper aus dem Trub von Bohnenauszugswasser . . . . .	6. 8. 1956
Politis, J.: Untersuchungen über die cytologische Bildung der Phytomelane bei einigen <i>Zinnia</i> -Arten . . . . .	14. 8. 1956
Strugger, S.: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Plasmodesmen mit Hilfe der Uranylprägnierung an Wurzelmeristemen . . . . .	14. 8. 1956
Thaler, Irmitraud, und F. Weber: Vakuolenkontraktion in <i>Pinguicula</i> -Drüsenzellen . . . . .	30. 8. 1956
Schurz, J.: Eine röntgenographische Untersuchung von <i>Laminaria digitata</i> . . . . .	8. 9. 1956
Milovidov, P.: Robert Feulgen (1884—1955) . . . . .	15. 9. 1956
Overbeck, Gudrun: Zellphysiologische Studien an <i>Bryophyllum</i> im Zusammenhang mit dem täglichen Säurewechsel . . . . .	17. 9. 1956
Levitt, J.: The Moment of Frost Injury . . . . .	24. 9. 1956

Fortsetzung auf der IV. Umschlagseite

Fortsetzung von der III. Umschlagseite

Windisch, J., St. Hinkelmann und D. Stierand: Plasmochromatische Zellreaktionen bei degenerierender Phosphat-Applikation nach P-Mangelzüchtung	1. 10. 1956
Honsell, E.: Sulla presenza di succhi cellulari «vuoti» in <i>Nitella mucronata</i> o <i>Chara crinita</i>	19. 10. 1956
Spiekermann, Ruth: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Proplastiden	19. 10. 1956
Tazawa, M.: Neue Methode zur Messung des osmotischen Wertes einer Zelle	25. 10. 1956
Bartels, F.: Ungewöhnlich große Chloroplasten bei <i>Epilobium</i> -Bastarden	2. 11. 1956

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

## Protoplasmatologia Handbuch der Protoplasmaforschung

Unter Mitwirkung hervorragender internationaler Fachleute  
herausgegeben von

Prof. Dr. **L. V. Heilbrunn** und Prof. Dr. **F. Weber**  
Philadelphia Graz

In 14 Bänden

Das Handbuch erscheint in selbständigen Einzelveröffentlichungen, die in kurzen Zeitabständen aufeinanderfolgen und zu Bänden vereinigt werden. Jeder selbständig erscheinende Handbuchteil ist einzeln käuflich. Über die Disposition des Gesamtwerkes und die nächsten Veröffentlichungen gibt der Verlag bereitwilligst Auskunft

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches gilt der Vorbestellpreis als Subskriptionspreis weiter

Anfang 1957 erscheinen folgende neue Bandteile:

**Cytoplasma-Struktur in Pflanzenzellen.** Von Lotte Reuter, Privatdozent am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien. Mit 27 Textabbildungen. Etwa 40 Seiten.  
**Intravakuoläres Protoplasma.** Von Ernst Küster, Gießen (Lahn). Mit 7 Textabbildungen. Etwa 20 Seiten.  
**Plasmodesmata (Vegetable Kingdom).** By A. D. J. Meeuse, Pretoria. With 12 figures. Approx. 40 pages. Gr.-8°. (Band II/A/1/a/b/c.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen

S 150.—, DM 25.—, sfr. 25.60, \$ 5.95

S 186.—, DM 31.—, sfr. 31.70, \$ 7.40

**Die Ascorbinsäure in der Pflanzenzelle.** Von Helmut Metzner, Göttingen. Mit 26 Textabbildungen. Etwa 80 Seiten.  
**Vitamin C in the Animal Cell.** By G. H. Bourne, Department of Histology, London Hospital Medical College, London. With 50 figures. Approx. 90 pages. Gr.-8°. (Band II/B/2/b/a.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen

S 240.—, DM 40.—, sfr. 41.—, \$ 9.50

S 300.—, DM 50.—, sfr. 51.20, \$ 11.90

**Effets biologiques des Radiations. Aspects biochimiques.** Par Maurice Errera, Laboratoire de Morphologie animale, Laboratoire de recherches pour la protection des Populations civiles, Faculté des Sciences, Université Libre de Bruxelles. Avec 27 figures. Environ 260 pages. Gr.-8°. (Band X/3.)

Vorbestellpreis, gültig bis zum Erscheinen

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen

S 342.—, DM 57.—, sfr. 58.40, \$ 13.55

S 426.—, DM 71.—, sfr. 72.70, \$ 16.90

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

